



Universidad de Alcalá
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA

**APLICACIÓN DE UNA APROXIMACIÓN
POLIFÁSICA AL ESTUDIO DE LA
DIVERSIDAD DE ACTINOMICETOS
AISLADOS DE LÍQUENES**

TESIS DOCTORAL

Ignacio González Martínez

Alcalá de Henares, 2015

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ DE HENARES

DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA



Memoria presentada para optar al grado de Doctor por:

Ignacio González Martínez

Directora: Dra. Dña. **Olga Genilloud Rodríguez.**

Directora Científica de la Fundación Medina.

Tutor: Dr. D. **Juan Soliveri de Carranza.**

Catedrático de la Universidad de Alcalá de Henares



Fundación MEDINA
Avda. de Conocimiento, 34
Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud
18016 Granada

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS PARA SU PRESENTACIÓN

(Art. 21 del RD 1393/2007)

OLGA GENILLOUD RODRÍGUEZ, Directora científica de la **Fundación MEDINA**,
Centro de Excelencia en Investigación de Medicamentos Innovadores en Andalucía,

CERTIFICA que:

Que **Ignacio González Martínez** ha realizado la Tesis Doctoral titulada “**Aplicación de una aproximación polifásica al estudio de la diversidad de actinomicetos aislados de líquenes**”, realizada en el **Departamento de Microbiología del Centro de Investigación Básica de España (CIBE) de Merck Sharp & Dohme de España S. A.** y en el **Centro de Excelencia en Investigación de Medicamentos Innovadores en Andalucía (Fundación MEDINA)**, autoriza su presentación a trámite, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Granada, a 13 de julio de 2015

Fdo: **Olga Genilloud**
Directora de la Tesis

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ



DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA

D. Juan Soliveri de Carranza, Catedrático de Microbiología y Director del Departamento de Biomedicina y Biotecnología de la Universidad de Alcalá,

CERTIFICA:

Que **D. Ignacio González Martínez**, Licenciado en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado en el Departamento de Biomedicina y Biotecnología de la Universidad de Alcalá, bajo la dirección de la doctora **Dña. Olga Genilloud Rodríguez**, el trabajo de investigación titulado: **Aplicación de una aproximación polifásica al estudio de la diversidad de actinomicetos aislados de líquenes**, que presenta para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste, firmo el presente certificado en Alcalá de Henares a 13 de julio de 2015.

Fdo.: Dr. Juan Soliveri de Carranza

A mis padres.
A Mercedes e Ignacio.

Agradecimientos

“Cualesquiera que hayan sido nuestros logros, siempre nos ayudó alguien a alcanzarlos” Althea Gibson.

Mucha agua ha pasado bajo el puente desde que este trabajo empezara a tomar forma como un proyecto de tesis doctoral. De hecho, la idea inicial como objeto de estudio para la tesis no fueron los líquenes sino los actinomicetos aislados del Delta del Ebro. Durante estos años, han sido muchas las personas que me han ayudado a que llegue a materializarse esta tesis, por lo que pido disculpas de antemano por los olvidos que mi memoria pueda cometer por descuido que no por intención.

Me resulta muy complicado expresar en un corto espacio mi agradecimiento a todos los que me habéis ayudado a lo largo de estos años y la medida en que cada uno ha contribuido a que haya logrado culminar con éxito este esfuerzo. También sé que sabréis perdonarme por los olvidos y que los que me conocéis y compartís vuestras vidas y vuestra amistad conmigo sabéis lo que pienso y cómo os lo agradezco.

El primer lugar en mi memoria lo ocupa por descontado la Dra. Olga Genilloud, no sólo por haber aceptado dirigirme la tesis sino por lo mucho que he aprendido trabajando junto a ella, por transmitirme el interés por el mundo de los actinos, por el rigor científico y por todo lo vivido y compartido durante tantos años, tanto en la etapa de CIBE como en los últimos años en Granada.

A mis padres, porque sin sus esfuerzos y sacrificios continuos no hubiese podido llegar hasta aquí ni ser lo que soy y cómo soy. Ellos han sido siempre el modelo a imitar y el camino a seguir. Os quiero.

A Mercedes e Ignacio, porque siempre están ahí, fieles e incondicionales, por haberme aguantado pacientemente en todo momento, por haber soportado el tiempo que les he robado y que no he podido compartir con ellos ni disfrutar de ellos. Por ser la luz que me guía, mi centro de gravedad permanente, mi estímulo y mi refugio. Gracias. Os quiero.

A mis hermanos, Isabel, Manolo, Cristina y Belén y a los “postizos”, Esteban, M^a José, Gabriel y Beatriz. A mis sobrinos, Roberto, Sara, Daniel, Julieta y Olivia. A mis suegros, Ángel y Mercedes, a mis cuñados, Miguel y Amalia, y a mis sobrinos Gonzalo, Miguel e Ignacio, mi ahijado. Os quiero.

A Fernando Peláez, que como director del CIBE siempre me apoyó e impulsó el desarrollo profesional, poniendo a mi disposición todos los recursos que he necesitado.

A Paqui, puesto que sin su insistencia, tesón y apoyo este camino no hubiera comenzado y continuado.

A Juan Soliveri, por su constante disposición para ayudarme en todo momento.

A Soledad Morales, por su permanente amabilidad, su eficacia, su diligencia y disposición para resolver cualquier duda o pregunta burocráticas. A Enriqueta Arias y José Luis Copa por el interés mostrado por el desarrollo y progreso de la tesis.

Desde estas líneas quiero rendir un pequeño tributo y homenaje a todos los integrantes del CIBE, porque todos ellos de alguna manera, en mayor o menor medida aportaron su granito de arena. Especialmente a las personas que formaban parte del grupo de Productos Naturales. Sobre todo quiero recordar al “Equipo A”: Aurora, Oroxia, Amalia, Maribel y Óscar, no sólo por lo mucho que he aprendido de todos ellos y lo mucho que me han ayudado en todo momento, sino por su compañerismo y amistad. Ellos fueron de alguna manera “mi otra familia”, con quienes he compartido muchos años de mi vida, los momentos buenos y los regulares de cada día. También guardo un sitio especial en mi memoria para el grupo de “hongos”: Asun, Ana Sánchez, Ana Pérez, M^a Rosa, Javier, Gonzalo y Gerald. Por las risas compartidas, (por los viajes en tren), por tantos buenos momentos, dentro y fuera del CIBE. A los integrantes del grupo de ensayos (Pilar Gómez (Cartu), Julia Feliz, Mercedes, Jesús, Ángela, Antonio) y a los del grupo de Química (Pili Ramos, Nines, Pilar Hernández, Rubén) porque de todos ellos he aprendido mucho.

Mención aparte, quiero recordar a otros compañeros del CIBE no sólo por lo mucho que me han ayudado sino por haberme regalado su amistad. Óscar Salazar, mi gran amigo y “mi maestro”, por haber tenido la suerte de compartir tantas horas de despacho juntos, de confidencias y de conversaciones “sobre la vida y la muerte”, por compartir los buenos momentos y sobre todo los menos buenos, por su generoso apoyo y estímulo constante. A Paco, Rubén y Eduardo, no sólo por su apoyo profesional sino también por los momentos de ocio, las excursiones, las cañas, los fines de semana y las muchas risas, corderos y paellas compartidos.

A Lucía Herranz, porque sin su determinante ayuda mi vida profesional hubiese ido por otros caminos desconocidos. A mis amigos de siempre, Javier, Alberto, Lucía Escolar, Mar Pérez, por su amistad permanente.

Por último, también quiero agradecer a los nuevos compañeros de la aventura “granaína”, Daniel, Sara, Marina, Mar, Bernabé, por su pronta disposición y ayuda constante en esta nueva etapa. A Javier Pascual, por su MEGA-ayuda, por estar siempre dispuesto a enseñarme a manejar los datos de secuencias y de filogenia, sin importar la hora.

A todos vosotros, simplemente

GRACIAS

Abreviaturas

ADN	Ácido Desoxirribonucleico (en inglés DNA)
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados)
ANI	average nucleotide identity (identidad nucleotídica media)
APH	Aminoglycoside PHosphotransferase (fosfotransferasa de aminoglicósidos)
ARDRA	Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (Análisis de Restricción del ADN Ribosómico Amplificado)
ARNr	Ácido Ribonucleico Ribosómico
ARNt	Ácido Ribonucleico de Transferencia
BH	Brain-Heart agar (extracto de cerebro y corazón de ternera con agar)
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (herramienta informática de alineamiento de secuencias (ADN o proteínas) de tipo local)
BSA	Bovine Serum Albúmine (Seroalbúmina bovina)
°C	grados centígrados
Da	Dalton
DAD	Diode Array Detector (Detector de diodos en matriz)
DDH	DNA-DNA Hybridization (hibridación ADN-ADN)
DMSO	Dimetil-sulfóxido
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato (monómeros del ADN: desoxiadenilato trifosfato (dAMP), desoxitimidilato trifosfato (dTMP), desoxicitidilato trifosfato (dCMP), desoxiguanilato trifosfato (dGMP))
EDTA	EthyleneDiamineTetraAcetic acid (ácido etilendiaminotetraacético) ($C_{10}H_{16}N_2O_8$)
ERIC-PCR	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR (PCR consenso intergénica repetitiva de enterobacterias)
ESI-MS	ElectroSpray Ionization- Mass Spectrometry (Espectrometría de Masas con Ionización por Electro Espray)
FAMEs	Fatty Acid Methyl Esters (Ésteres metílicos de los ácidos grasos)
FID	Flame Ionization Detector (Detector por Ionización de Llama)
FT-IR	Fourier Transform-Infra Red (técnica espectroscópica de Infrarrojos con Transformada de Fourier)
GBDP	genome BLAST distance phylogeny (distancia filogenética del genoma BLAST)
g/L	cantidad de gramos por unidad de volumen en litros

HMG CoA	3-Hidroxi-3-MetilGlutaril coenzima A
HPLC	High Preassure Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Presión)
HTS	High-Throughput Screening (criado de alto rendimiento)
IC	Intervalo de confianza
ITS	Internal Transcribed Spacer (Espaciador Interno Transcrito)
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada)
JC	Jukes-Cantor (modelo evolutivo propuesto por Jukes y Cantor)
l	litro
LB	Luria Bertani (medio de cultivo LB)
MALDI-MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization -Mass Spectrometry (Espectrometría de Masas mediante Desorción por Ionización Láser Asistida por Matriz)
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight (Espectrometría de Masas mediante Desorción por Ionización Láser Asistida por Matriz-Tiempo de vuelo)
MES	Ácido 2-(N-Morpholino) ethanosulfónico
μl	microlitros
μM	micromolar
mg	miligramos.
ml	mililitros
mM	milimolar
min	minutos
MLEE	<i>MultiLocus</i> Enzyme Electrophoresis (electroforesis de enzimas <i>multilocus</i>)
MLSA	<i>MultiLocus Sequence Analysis</i> (Análisis de secuencias multigénicas)
MLST	<i>MultiLocus Sequence Typing</i> (Caracterización mediante secuencias multigénicas)
MRSA	Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (cepa de <i>S. aureus</i> resistente a meticilina)
MS	Mass Spectrometry (Espectrometría de Masas)
MUMi	maximal unique matches index (máximo índice de coincidencia única)
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para la Información Biotecnológica)
NGS	Next-Generation Sequencing (siguiente generación de secuenciación)
NJ	Neighbour Joining (algoritmo de distancias)
NRPS	Nonribosomal Peptide Synthetase (sintetasa de péptidos no ribosomales)

nt	nucleótido
ORF	Open Reading Frame (Fase de Lectura Abierta)
OSMAC	One Strain, Many Compounds (Una Cepa, Muchos Compuestos)
OTU	Operational Taxonomic Unit (Unidad Taxonómica Operacional)
PAGE-SDS	PolyAcrilamye Gel Electrophoresis-Sodium Docecyl Sulfate (Electroforesis en Geles de Poliacrilamida con SDS)
pb	pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis (electroforesis de campo pulsado)
PKS	Polyketide Synthase (sintasa de poliquétidos)
Pm	Peso Molecular
PyMS	Pyrolysis Mass Spectrometry (Espectrometría de masas en el Punto de Pirólisis)
RAPD	Randomly Amplified Polymorphic DNA analysis (Análisis de Polimorfismos de ADN por Amplificación al Azar)
rep-PCR	REPetitive-PCR (PCR Repetitiva)
REP-PCR	Repetitive Extragenic Palindromic-PCR (PCR repetitive extragénica palindrómica)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción)
r.p.m	revoluciones por minuto
S	coeficiente de sedimentación Svedberg
SDA	Sabouraud Dextrose Agar (medio Sabouraud con dextrosa y agar)
SDB	Sabouraud Dextrose Broth (caldo Sabouraud con dextrosa)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (dodecil sulfato sódico) ($C_{12}H_{25}NaO_4S$)
sp.	especie
spp.	especies
s	segundos
SSCP	Single-Strand Conformation Polymorphism o Single-Strand Chain Polymorphism (Polimorfismos de Cadena Sencilla)
T	temperatura
Taq pol	ADN polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
TGH	Tranferencia Génica Horizontal
Tm	melting temperature (temperatura de fusión)
TOF	Time Of Flight (Tiempo de vuelo)
U	unidades

UPGMA	Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean (método de agrupamiento por pares no ponderado con media aritmética)
UV	Ultravioleta
YME	Yeast Malt Extract (medio de cultivo para actinomicetos con Extracto de Levadura y Extracto de Malta)

ABSTRACT

Actinomycetes, one of the major communities of the microbial population present in soil, can also be found inhabiting a wide diversity of ecological sources. We have explored the use of lichens as an alternative source for the isolation of novel actinomycetes. Lichens are symbiotic mixtures of fungi, green algae and/or cyanobacteria and whereas these symbiotic components have been extensively described, the microbial community inhabiting this niche has not been well characterized. We studied the diversity of the actinomycete population isolated from lichens collected in tropical areas from the Hawaii and Reunion islands and in cold areas from Alaska. The diversity of the microbial population was evaluated using fatty acid analysis and molecular fingerprinting. A PCR approach to screen the isolates for genes associated with secondary metabolite production was applied to evaluate the biosynthetic potential of these strains; profiles obtained for each isolate were compared to the antimicrobial activity exhibited by these isolates in laboratory conditions. Our results demonstrate that lichens represent an extremely rich reservoir for the isolation of a wide diversity of actinomycetes many of them representing still today a rich untapped source of secondary metabolites.

RESUMEN

Los actinomicetos, una de las comunidades mayoritarias de la población microbiana presente en los suelos, pueden también encontrarse habitando una amplia diversidad de entornos ecológicos. En el presente trabajo, hemos explorado el uso de líquenes como una fuente alternativa para el aislamiento de nuevos actinomicetos. Los líquenes son el resultado de la simbiosis entre un hongo, un alga verde y/o cianobacterias y, mientras que estos componentes simbióticos han sido ampliamente descritos, la comunidad microbiana que habita este nicho ecológico no ha sido bien caracterizada. Hemos estudiado la diversidad de la población de actinomicetos aislados de líquenes procedentes de zonas tropicales de las islas de Hawai y de Reunión y de zonas frías de Alaska. La diversidad de la población microbiana se evaluó mediante el análisis de los ácidos grasos y mediante un tipado (fingerprinting) molecular. También hemos realizado una prospección en las cepas de genes asociados a la producción de metabolitos secundarios haciendo uso de una amplificación mediante PCR para evaluar el potencial biosintético de estas cepas; los perfiles obtenidos de cada cepa se compararon con la actividad antimicrobiana mostrada por estas cepas en condiciones de laboratorio. Nuestros resultados demuestran que los líquenes representan un reservorio extremadamente rico para el aislamiento de una amplia diversidad de actinomicetos, muchos de los cuales representan todavía hoy una gran fuente de metabolitos secundarios sin descubrir.

Índice

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Interés de los productos naturales en biotecnología.	3
1.1.1. Programas de búsqueda de nuevos fármacos a partir de productos naturales.	4
1.1.2. Obtención de productos naturales a partir de metabolitos secundarios.	5
1.2. Los actinomicetos.	7
1.2.1. Importancia de los actinomicetos: su metabolismo secundario.	8
1.3. Biodiversidad microbiana y bioprospección.	16
1.3.1. Aislamiento de actinomicetos de muestras ambientales.	17
1.3.2. Los líquenes como fuente para el aislamiento de actinomicetos.	19
1.3.3. Diversidad microbiana.	23
1.4. Clasificación e identificación de los actinomicetos.	29
1.4.1. Quimiotaxonomía.	29
1.4.1.1. <u>Análisis de la composición de lípidos.</u>	29
a.- Ácidos grasos celulares.	30
b.- Otros lípidos con aplicaciones taxonómicas.	34
1.4.1.2. <u>Análisis de los constituyentes de la pared celular.</u>	34
a.- Isómeros del ácido diaminopimélico.	35
b.- Composición de azúcares de células enteras.	35
1.4.1.3. <u>Análisis de proteínas celulares totales.</u>	35
a.- Análisis mediante MALDI-TOF.	36
1.4.2. Caracterización molecular.	37
1.4.2.1. <u>Reasociación de ácidos nucleicos.</u>	37
1.4.2.2. <u>Análisis del ARN ribosomal.</u>	38
1.4.2.3. <u>Secuenciación del gen ribosomal 16S.</u>	39
1.4.2.4. <u>Análisis filogenético.</u>	40
1.4.2.5. <u>Análisis multigénico (MLSA).</u>	41
1.4.2.6. <u>Secuenciación de genomas.</u>	42
1.5. Estimación de la diversidad de las cepas aisladas: índices de diversidad.	43
1.6. Técnicas moleculares y fenotípicas aplicadas al estudio de la diversidad de las cepas aisladas.	45

1.6.1.	Caracterización basada en perfiles de amplificación por PCR: ADN fingerprinting.	45
1.6.1.1.	<u>Polimorfismos de longitud de las regiones espaciadoras de los genes 16S-23S: IGS-PCR.</u>	47
1.6.1.2.	<u>Amplificación de los espacios intergénicos de los genes para tRNA (tADN-PCR).</u>	47
1.6.1.3.	<u>Amplificación de secuencias genómicas repetidas (rep-PCR).</u>	48
	a.- REP-PCR.	49
	b.- ERIC-PCR.	50
	c.- BOX-PCR.	50
	d.- (GTG) ₅ .	51
1.6.2.	Caracterización basada en la detección de secuencias específicas de rutas biosintéticas: sistemas PKS-I, PKS-II, NRPS, APH y HMG CoA reductasa.	51
1.6.3.	Caracterización basada en perfiles de restricción: RFLP.	53
1.6.4.	Caracterización química: perfiles de metabolitos secundarios mediante HPLC o HPLC-MS.	54
1.6.5.	Determinación de la actividad biológica antibacteriana y antifúngica.	54
1.7.	Herramientas de análisis de datos.	55
1.7.1.	Aspectos generales.	55
1.7.2.	Análisis de <i>clusters</i> de datos de FAMES.	57
1.7.3.	Análisis de <i>clusters</i> de perfiles de amplificación o de restricción.	58
1.7.4.	Análisis de secuencias del gen 16S ARNr.	60
2.	OBJETIVOS	63
2.1.	Antecedentes.	65
2.2.	Objetivo general.	65
2.3.	Objetivos específicos.	66
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	67
3.1.	Origen de las muestras.	69
3.2.	Aislamiento de actinomicetos.	70
3.2.1.	Métodos de aislamiento.	70

3.2.1.1.	<u>Método de Dilución (DIL).</u>	70
3.2.1.2.	<u>Pretratamiento con calor seco (HOT).</u>	70
3.2.1.3.	<u>Pretratamiento con Cloruro de Bencetonio (BC) y Gluconato de Clorhexidina (GC).</u>	70
3.2.2.	Medios de aislamiento.	71
3.2.3.	Mantenimiento y preservación de cultivos.	72
3.3.	Identificación morfológica.	72
3.4.	Análisis de ácidos grasos (FAMES) mediante cromatografía de gases.	72
3.5.	Técnicas genotípicas basadas en los perfiles de amplificación mediante PCR.	73
3.5.1.	Extracción del ADN.	73
3.5.2.	Amplificación del ADN mediante PCR para la caracterización de cultivos (PCR <i>fingerprinting</i>).	74
3.5.2.1.	<u>Amplificación de la región intergénica 16S-23S (IGS-PCR).</u>	74
3.5.2.2.	<u>tADN-PCR.</u>	74
3.5.2.3.	<u>rep-PCR: REP-PCR, ERIC-PCR, BOX-PCR y (GTG)₅.</u>	74
3.5.3.	Detección de secuencias específicas de genes biosintéticos: sistemas PKS-I, PKS-II, NRPS, APH y HMG CoA reductasa.	77
3.5.3.1.	<u>Digestión con la enzima <i>Hin</i> F1 de los productos de amplificación de los sistemas PKS-I, PKS-II y NRPS.</u>	79
3.5.4.	Análisis de los perfiles electroforéticos.	80
3.5.4.1.	<u>Geles de poliacrilamida.</u>	80
3.5.4.2.	<u>Geles de agarosa.</u>	80
3.5.5.	Secuenciación del gen ribosomal 16S rADN y análisis filogenético.	80
3.6.	Técnicas para el análisis de metabolitos secundarios.	83
3.6.1.	Actividades antimicrobianas producidas por tacos de agar de los cultivos.	83
3.6.1.1.	<u>Preparación de los inóculos y de las placas de ensayo.</u>	84
3.6.1.2.	<u>Realización del ensayo.</u>	85
3.6.2.	Actividades antimicrobianas producidas por microfermentaciones en medios sólidos y en medios líquidos.	85
3.6.2.1.	<u>Fermentación de cultivos.</u>	86
3.6.2.1.1.	Fermentaciones en medios líquidos.	86
3.6.2.1.2.	Fermentaciones en medios sólidos.	92
3.6.2.2.	<u>Extracción de las fermentaciones.</u>	93

3.6.2.2.1.	De medios líquidos.	93
3.6.2.2.2.	De medios sólidos.	93
3.6.2.3.	<u>Detección de actividades antimicrobianas de los extractos de la fermentación.</u>	93
3.6.2.4.	<u>Análisis de los metabolitos mediante LCMS.</u>	95
3.6.2.4.1.	Método <i>Gold</i> .	95
3.7.	Análisis de <i>clusters</i>.	96
3.7.1.	Análisis de <i>clusters</i> según la composición de ácidos grasos de los cultivos.	96
3.7.2.	Análisis de <i>clusters</i> según los patrones de amplificación o de digestión (PCR-<i>fingerprinting</i>).	96
3.8.	Análisis estadísticos para la comparación de técnicas y de la diversidad de la población estudiada.	97
3.8.1.	Comparación de técnicas.	97
3.8.2.	Estimación de la diversidad de las cepas aisladas.	97
4.	RESULTADOS.	99
4.1.	Aislamiento de actinomicetos a partir de muestras de líquenes.	101
4.2.	Caracterización y evaluación de la diversidad según el análisis de ácidos grasos (FAMES).	106
4.3.	Secuenciación del gen ribosomal 16S rADN.	113
4.4.	Reclasificación de cepas según los análisis de FAMES y de la secuenciación del 16S.	118
4.5.	Análisis filogenético de las cepas de actinomicetos identificados.	118
4.6.	Caracterización de las cepas de los grupos taxonómicos mayoritarios mediante el análisis de perfiles de amplificación (<i>fingerprinting</i>).	130
4.6.1.	Caracterización de cepas del género <i>Streptomyces</i>.	132
4.6.1.1.	<u>Amplificación de la región intergénica 16S-23S (IGS-PCR).</u>	132
4.6.1.2.	<u>tADN-PCR.</u>	135
4.6.1.3.	<u>rep-PCR.</u>	138
a.-	BOX-PCR.	138
b.-	ERIC-PCR.	142
c.-	REP-PCR.	146
d.-	(GTG) ₅ -PCR.	149
4.6.2.	Caracterización de cepas de la familia <i>Micromonosporaceae</i>.	153

4.6.2.1.	<u>Amplificación de la región intergénica</u>	
	<u>16S-23S (IGS-PCR).</u>	153
4.6.2.2.	<u>tADN-PCR.</u>	157
4.6.2.3.	<u>rep-PCR.</u>	162
	a.- BOX-PCR.	162
	b.- ERIC-PCR.	167
	c.- REP-PCR.	172
	d.- (GTG) ₅ -PCR.	177
4.6.3.	Caracterización de cepas de la familia <i>Pseudonocardiaceae</i>.	182
4.6.3.1.	<u>Amplificación de la región intergénica</u>	
	<u>16S-23S (IGS-PCR).</u>	182
4.6.3.2.	<u>tADN-PCR.</u>	182
4.6.3.3.	<u>rep-PCR.</u>	184
	a.- BOX-PCR.	184
	b.- ERIC-PCR.	186
	c.- REP-PCR.	188
	d.- (GTG) ₅ -PCR.	190
4.7.	Comparación de técnicas basadas en perfiles de amplificación.	192
4.8.	Estimación de la diversidad de las cepas según la técnica empleada.	195
4.9.	Detección de secuencias específicas de genes biosintéticos:	
	sistemas PKS-I, PKS-II, NRPS, APH y HMG CoA reductasa.	200
4.9.1.	Perfiles de digestión con la enzima <i>Hin</i> F1 de los productos	
	De amplificación de los sistemas PKS-I, PKS-II y NRPS.	204
4.10.	Evaluación de actividades antimicrobianas (antibacterianas y	
	antifúngicas).	211
4.11.	Relación entre la presencia de sistemas PKS y NRPS y actividad	
	antimicrobiana en cepas salvajes de actinomicetos.	214
4.12.	Producción de metabolitos secundarios.	217
4.12.1.	Microfermentación de cepas de la familia <i>Pseudonocardiaceae</i>.	217
4.12.1.1.	<u>Detección de actividades antimicrobianas en los extractos de</u>	
	<u>fermentación.</u>	218
4.12.1.2.	<u>Detección de metabolitos conocidos mediante LC-MS en los</u>	
	<u>extractos activos.</u>	233
4.12.2.	Microfermentación de cepas de otras taxonomías: detección	
	de metabolitos mediante LC-MS en los extractos activos.	235

5. DISCUSIÓN.	239
5.1. Diversidad de las cepas aisladas de líquenes.	241
5.1.1. Evaluación de la diversidad de las cepas según el origen de los líquenes e influencia de los métodos de aislamiento.	241
5.1.2. Evaluación de la diversidad según la composición de ácidos grasos.	244
5.1.3. Análisis de las secuencias del gen ribosomal 16S rADN.	247
5.1.4. Análisis filogenético de los actinomicetos.	250
5.1.5. Evaluación de la diversidad según los perfiles de amplificación mediante PCR.	250
5.1.5.1. <u>Diversidad de la familia <i>Micromonosporaceae</i>.</u>	252
5.1.5.2. <u>Diversidad de la familia <i>Pseudonocardiaceae</i>.</u>	253
5.1.5.3. <u>Diversidad del género <i>Streptomyces</i>.</u>	254
5.1.6. Distribución de sistemas biosintéticos: sistemas PKS-I, PKS-II, NRPS, APH y HMG CoA reductasa.	257
5.1.6.1. <u>Diversidad de las cepas según su potencial biosintético.</u>	261
5.1.7. Actividad antimicrobiana y presencia de sistemas biosintéticos en cepas salvajes de actinomicetos.	262
5.1.8. Diversidad de los metabolitos secundarios de las cepas de la familia <i>Pseudonocardiaceae</i> .	265
6. CONCLUSIONES.	269
7. BIBLIOGRAFÍA.	273
8. GLOSARIO DE TABLAS Y FIGURAS.	321
9. ANEXOS.	329
9.1. Anexo 1: fotos de las cepas de actinomicetos.	331
<i>Micromonosporaceae</i>	331
<i>Pseudonocardiaceae</i>	336
<i>Streptomyces</i>	337
<i>Thermomonosporaceae</i> y <i>Streptosporangiaceae</i>	341

<i>Gordoniaceae y Nocardiaceae</i>	341
<i>Micelios estériles y Geodermatophilaceae</i>	341
9.2. Anexo 2: Nomenclatura de los ácidos grasos utilizados para su clasificación según la IUPAC.	342
9.3. Anexo 3: Ácidos grasos mayoritarios de los cultivos analizados por FAMES en cada <i>cluster</i> .	343
9.4. Anexo 4: Dendrograma de las cepas analizadas mediante FAMES.	356
9.5. Anexo 5: Listado con el origen geográfico e identificación de las cepas estudiadas.	360
9.6. Anexo 6: coeficientes de proximidad y de distancia y métodos de <i>clustering</i> .	375
1.- <u>Medidas de distancia y de similitud.</u>	375
2.- <u>Métodos de <i>clustering</i>.</u>	376

Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Interés de los productos naturales en biotecnología.

Los productos naturales, a menudo también denominados metabolitos secundarios, son moléculas orgánicas de bajo peso molecular producidos por organismos vivos tales como bacterias, hongos, líquenes, invertebrados marinos, plantas, insectos e incluso mamíferos, y que no son estrictamente necesarias para su supervivencia, a diferencia de otras macromoléculas como proteínas o ácidos nucleicos que constituyen la maquinaria básica de los procesos biológicos fundamentales (Cannell, 1998). El interés en estas moléculas es inmenso ya que han sido empleadas por el ser humano desde tiempo inmemorial con diversos propósitos, principalmente en medicina pero también se han empleado como pigmentos y tintes, fragancias, venenos o con otros fines biotecnológicos (Davies y Ryan, 2011). Históricamente, los productos naturales han sido el objeto de intensivos programas de búsqueda de nuevos antibióticos, siendo la mayoría de los antibióticos introducidos en la clínica para el tratamiento de las infecciones bacterianas en los últimos 50 años, productos naturales producidos por bacterias del grupo de los actinomicetos (Peláez, F. y Genilloud, O., 2009; Singh et al., 2010).

La biotecnología se fundamenta en la utilización de los recursos biológicos o de su potencial genético como fuente de nuevos productos de valor. Tradicionalmente, esta idea se ha sustentado en el aislamiento de los microorganismos y su cultivo para obtener la máxima expresión génica y el posterior cribado para seleccionar las propiedades deseadas de los metabolitos producidos. Por consiguiente, la biotecnología está íntimamente ligada con el descubrimiento de entidades biológicas explotables y novedosas, bien sea en términos de microorganismos, de sus genes o de sus productos metabólicos o actividades. Así pues, el descubrimiento de nuevas moléculas con aplicación biotecnológica depende del reconocimiento de organismos novedosos, de nuevas dianas biotecnológicas y de la invención de nuevas estrategias de investigación y cribado.

En este contexto, surge la pregunta de si la explotación de la microbiología está ya agotada o si sigue siendo una fuente inagotable de recursos. El papel de los productos naturales en mejorar la calidad de vida del ser humano, continuará siendo fundamental tanto en cuanto siga habiendo fuentes de productos naturales sin explotar (Clark, 1996). Nisbet y Moore (1997) afirman que sin productos naturales habrá un significativo déficit clínico en algunas áreas terapéuticas como enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas, tumores y enfermedades inmunes e inflamatorias. Uno de los hechos más reveladores es la publicación constante y mantenida de nuevos productos naturales con nuevas estructuras e interesantes actividades biológicas (Newman y Cragg, 2012), a pesar de que la química combinatoria y la síntesis han desplazando a los productos naturales en la industria farmacéutica. No obstante, un número creciente de autores creen que estas aproximaciones son complementarias y no mutuamente excluyentes (Demain, 1998; Demain, 1999; Peláez y Genilloud, 2003; Demain, 2006; Demain y Adrio, 2008; Demain, 2009; Demain y Sanchez, 2009; Genilloud y Vicente, 2012; Genilloud y Vicente, 2014).

Los productos naturales representan un arsenal de compuestos con estructuras únicas que no puede ser suplantado por la química combinatoria. En este sentido tienen la mayor importancia los trabajos realizados por Henkel y colaboradores (1999) con el objetivo de “describir estadísticamente las diferencias entre las propiedades de los productos naturales y de los compuestos de origen sintético con el fin de afirmar la complementariedad de estas dos fuentes de estructuras”. Los autores concluyeron que la evaluación estadística reveló una diferencia en las propiedades estructurales de los productos naturales en comparación con los compuestos sintéticos y que el potencial de los productos naturales nuevos no estaba agotada: “la afirmación de que los productos naturales han sido ya suficientemente examinados queda, por tanto, totalmente rechazada” (Henkel *et al.*, 1999). Por ejemplo, el entorno marino es una fuente de productos naturales novedosos destacable con más de 10.000 compuestos descritos (Proksch *et al.*, 2002; Blunt *et al.*, 2014) así como de microorganismos endófitos (Janso y Carter, 2010; Li *et al.*, 2012).

Así pues, la explotación de nuevos microorganismos obtenidos de recursos naturales novedosos sigue siendo fundamental para la obtención de nuevos productos naturales con aplicación biotecnológica.

1.1.1. Programas de búsqueda de nuevos fármacos a partir de productos naturales.

En las últimas décadas las grandes compañías farmacéuticas han eliminado, o al menos en gran medida disminuido, la investigación en productos naturales como fuente de nuevos fármacos en gran parte debido al alto coste y plazos de desarrollo de estas actividades, enfocándose en su lugar en el uso de compuestos sintéticos y librerías combinatorias. Sin embargo, la química combinatoria acoplada al cribado de alto rendimiento no ha sido todo lo productiva que se esperaba (Payne, 2007). Las nuevas aproximaciones están combinando una bioprospección inteligente de la diversidad microbiana con las nuevas técnicas como la genómica, proteómica, metabolómica, metagenómica, cribado de alto rendimiento y bioinformática.

Tradicionalmente, los programas de descubrimiento de nuevos fármacos se han basado en dos aspectos fundamentales: por un lado, en la identificación y validación de nuevas dianas terapéuticas y por otro, garantizar el aislamiento de nuevas entidades químicas capaces de alterar estas dianas (Ulrich y Friend, 2001). Por este motivo ha sido fundamental disponer de colecciones de compuestos químicos que proceden, tradicionalmente, de productos naturales (Tulp y Bohlin, 2002) o de compuestos sintéticos o semisintéticos generados por química combinatoria (Geysen *et al.*, 2003). La enorme diversidad química que ofrece la naturaleza ha determinado la utilización durante décadas de productos naturales en el proceso de descubrimiento de nuevos fármacos. Los productos naturales utilizados en los programas industriales de cribado se obtienen normalmente a partir de plantas, organismos marinos, insectos y principalmente de microorganismos. Dentro de estos últimos, dos grupos han demostrado poseer una excepcional riqueza en el número y diversidad de metabolitos secundarios producidos: los actinomicetos y los hongos (Demain, 1999; Peláez y Genilloud, 2003; Demain, 2006; Demain y Adrio, 2008; Demain, 2009; Demain y Sanchez, 2009; Genilloud y Vicente, 2012; Genilloud y Vicente, 2014; Marinelli y Genilloud, 2014).

Al plantear la pregunta de si los actinomicetos están agotados como fuente de metabolitos secundarios, Bérdy (2005) destacó la necesidad de responder a varias necesidades de la investigación en este campo como son, i) técnicas de aislamiento selectivas para el descubrimiento de nuevas cepas productoras; ii) mayor énfasis en especies raras o difíciles de cultivar; iii) implementación de técnicas de desreplicación para reducir la tasa de redescubrimiento. Lazzarini y colaboradores (2000 y 2001) demostraron durante una campaña de búsqueda de compuestos bioactivos producidos por actinomicetos, que un significativo número de los denominados “taxones raros” eran fuentes de nuevos antibióticos. Estos autores demostraron que el uso de métodos de aislamiento selectivo apropiados, permite el aislamiento de estos taxones de muchas muestras de tierra, y que la utilización de un gran número de cepas, estrategia adoptada por la industria en el descubrimiento de nuevos fármacos, “no permite generalmente una caracterización taxonómica completa de todas las cepas”. Watve y colaboradores (2001) plantean si existe un límite al número de antibióticos producidos por el género *Streptomyces*. El modelo de Watve predice que los *Streptomyces* son capaces de producir hasta 10^5 antibióticos. Estos autores argumentan que el retroceso en el descubrimiento de nuevos compuestos se debe a la disminución en los esfuerzos de búsqueda más que a un agotamiento de los compuestos. Entre las críticas que pueden hacerse a este tipo de análisis es la caracterización taxonómica errónea de los organismos.

1.1.2. Obtención de productos naturales a partir de metabolitos secundarios.

Desde un punto de vista industrial, los metabolitos secundarios producidos por hongos y bacterias son una de las más importantes fuentes de nuevos compuestos bioactivos que ha sido tradicionalmente más utilizada por la industria farmacéutica puesto que los productos naturales obtenidos de los mismos han determinado la síntesis de nuevas moléculas derivadas de ellos o inspiradas en dichas estructuras con actividades biológicas y diversas aplicaciones como son los antibióticos, antitumorales, antiparasitarios, herbicidas, algicidas e insecticidas.

En este aspecto, los actinomicetos son microorganismos de gran relevancia, ya que constituyen un grupo con una gran diversidad y con un elevado potencial como productores de nuevos metabolitos secundarios. Existen numerosos ejemplos de metabolitos secundarios producidos por actinomicetos con un amplio espectro de propiedades terapéuticas como antibióticos (penicilina, cefalosporina, eritromicina, etc), antifúngicos (anfotericina), antihelmínticos (ivermectina), inmunosupresores (FK506, rapamicina), anticancerígenos (daunorrubicina, doxorubicina, bleomicina, etc), antivirales (quinoxapeptina) etc. (Tabla 1) (Walsh *et al.*, 2003).

Cualquier programa de cribado de productos naturales producidos por actinomicetos requiere el aislamiento inicial y selección de un elevado número de cepas salvajes a partir de una amplia diversidad de entornos procedentes de suelos, sedimentos, rizosferas, material vegetal en descomposición, rocas (Salazar *et al.*, 2006), tapetes microbianos (Guerrero *et al.*, 1993), líquenes (González *et al.*, 2005), ambientes marinos (Kelecom, 2002; Mincer *et al.*, 2002; Pathom-aree *et al.*, 2006) y ambientes extremos con un pHs ácidos o básicos (Basilio *et al.*, 2003), en presencia de metales pesados (Sánchez-Andrea *et al.*, 2011) o en lagos de la Antártida (Obata *et al.*, 1999; Brambilla *et al.*, 2001; Van

Trappen *et al.*, 2002; Rojas *et al.*, 2009). Estos cultivos tienen que ser seleccionados para ser posteriormente cultivados en un amplio número de medios de producción, de los que se extraen, mediante diversos métodos y con diferentes solventes, los compuestos producidos. Estos extractos pueden ser utilizados en diferentes ensayos para detectar los compuestos activos frente a diversas dianas terapéuticas (Peláez y Genilloud, 2003; Genilloud y Vicente, 2012; Genilloud y Vicente, 2014; Marinelli y Genilloud, 2014).

Un factor clave que determina el éxito de este proceso sigue determinado por los criterios utilizados en la selección de las cepas que se van a incluir en la colección así como las herramientas disponibles para asegurar la mayor biodiversidad dentro de un grupo. El reconocimiento desde etapas tempranas de la mayor diversidad posible de cepas salvajes es un punto clave en cualquier programa de búsqueda de nuevos fármacos con el fin de poder asegurar la selección de aquellos cultivos más diversos, partiendo de la premisa de que una mayor diversidad microbiana conlleva una mayor diversidad de metabolitos secundarios bioactivos con un posible potencial terapéutico. En consecuencia, la eficacia de los programas de cribado de productos naturales depende en gran medida de los criterios empleados para seleccionar los cepas salvajes.

La desreplicación puede definirse como el proceso para reconocer especies o cepas de microorganismos similares, y/o la presencia de productos naturales conocidos, y en consecuencia, evitar un esfuerzo de cribado redundante e inútil (Bull *et al.*, 1992; Kuo y Garrity, 2002; Wagner-Döbler *et al.*, 2002). La discriminación entre cepas por debajo del nivel de especie es esencial porque la diversidad genética dentro de una especie con frecuencia determina la capacidad de producción de metabolitos secundarios y enzimas.

Sin embargo, la identificación exhaustiva de las bacterias siguiendo métodos taxonómicos clásicos no puede llevarse a cabo cuando se maneja un elevado número de cepas como es el caso de los programas de búsqueda de nuevos fármacos producidos por microorganismos. Por ello, cualquier método automatizado o semiautomatizado que pueda de forma fácil, rápida, fiable y reproducible caracterizar un gran número de cepas sería una herramienta excelente para la selección de aquellos cultivos que se van a ser ensayados.

La aplicación de una estrategia fiable que permita la diferenciación de las distintas cepas de bacterias aisladas basada en el uso integrado y simultáneo de información genotípica y fenotípica ha sido planteada por diversos autores (Vandamme *et al.*, 1996; Rosselló-Mora y Amann, 2001; Staley, 2006). Esta aproximación requiere el empleo de técnicas resolutivas capaces de diferenciar entre sí cultivos muy similares y consiste en aplicar una serie de análisis taxonómicos simultáneos o sucesivos basados en métodos que suministran información genotípica y fenotípica complementaria.

Tradicionalmente, el aislamiento y selección de cepas salvajes ha recaído siempre en la experiencia de los microbiólogos para reconocer, según los caracteres morfológicos, la singularidad de las nuevas cepas obtenidas a partir de diversas muestras ambientales (Miyadoh, 1997; Horan, 1999) y en la comparación de datos procedentes de técnicas quimiotaxonómicas y de *fingerprinting* de ADN. Entre las técnicas de caracterización quimiotaxonómicas más utilizadas cabe destacar el análisis de la composición celular de ácidos grasos (FAMES) (Vauterin *et al.*, 1996). Por otro lado, las técnicas moleculares se

fundamentan en el análisis de la variación genética de los organismos mediante la observación de sus polimorfismos genéticos. Estas técnicas genotípicas, conocidas en su conjunto como *fingerprinting* de ADN, se basan en general en la amplificación de fragmentos de ADN, bien en la amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD) (Mehling *et al.*, 1995b) como de secuencias repetitivas (REP-PCR) (Bull *et al.*, 2000), de fragmentos amplificados con diferentes longitudes (AFLP) (Savelkoul *et al.*, 1999) o en la amplificación de secuencias o genes específicos como los espaciadores intergénicos de los genes ribosomales (IGS-PCR) (Jensen *et al.*, 1993), de los genes ARNt (Loughney *et al.*, 1982; Welsh y McClelland, 1991; Welsh y McClelland, 1992) en la amplificación y digestión de los fragmentos amplificados (RFLP), como el análisis de restricción de las secuencias de ADNr amplificadas (ARDRA) (Maukonen *et al.*, 2003) o la amplificación, digestión e hibridación, con sondas específicas, de genes ribosomales (Ribotyping) (Ritacco *et al.*, 2003). Los métodos quimiométricos de caracterización de los organismos totales, tales como la espectrometría de masas en el punto de pirólisis (PyMS), (Brandao *et al.*, 2002), la espectroscopía por infrarrojos (FT-IR) (Magee *et al.*, 1994), la espectroscopía Raman y de transformada de Fourier y espectrometría de masas por MALDI (MALDI-MS) (Hitzeroth *et al.*, 2005) y por electrospray (ESI-MS) (Higgs *et al.*, 2001; Zahn *et al.*, 2001; Kell *et al.*, 2005) o el análisis de los perfiles de proteínas mediante PAGE-SDS (Pot *et al.*, 1994) son muy empleados para discriminar entre cepas (Goodfellow *et al.*, 1997; Goodacre *et al.*, 1998; Tindall *et al.*, 2000) y para su identificación (van Baar, 2000). Además, se ha observado que estas técnicas son congruentes con resultados obtenidos previamente por otros métodos. Por ejemplo, existe una excelente correlación entre la taxonomía numérica y PyMS y una alta congruencia entre PyMS y el *fingerprinting* molecular (PCR-RFLP, SSCP). La utilización de estos métodos de desreplicación permite asegurar la singularidad de las cepas ensayadas aunque ninguno de ellos aporta información acerca del potencial genético para producir metabolitos secundarios bioactivos.

1.2. Los actinomicetos.

Los actinomicetos son un grupo extremadamente diverso de bacterias filamentosas, ampliamente distribuidas en suelos así como en otros entornos, con un complejo ciclo biológico desde la formación inicial de micelio vegetativo a la posterior diferenciación con formación de micelio aéreo y esporulación. Son bacterias Gram-positivas y forman un grupo taxonómicamente complejo que se ha definido filogenéticamente como una serie de taxones de alto contenido en G+C, pertenecientes al *Phylum* “*Actinobacteria*”, dentro de la Clase “*Actinobacteria*”, integrada por 15 órdenes, 43 familias y 224 géneros (Bergey's, 2012). Fenotípicamente, las dos características principales que los distinguen de la mayoría de las demás bacterias son su crecimiento micelial, su complejo ciclo de formación y su capacidad para producir una amplia variedad de metabolitos secundarios.

Los actinomicetos están ampliamente distribuidos en suelos y otros hábitats terrestres y marinos donde han demostrado jugar un importante papel ecológico en el reciclaje de los nutrientes existentes en el nicho. La mayoría de las especies descritas son saprófitas y tienen la capacidad de usar casi cualquier fuente de nutrientes disponible para su desarrollo, pero también hay algunos pueden formar asociaciones parasíticas o simbióticas con plantas o animales. Aunque la mayoría de los estudios ecológicos sobre los actinomicetos se han enfocado principalmente en su distribución en suelos,

mayoritariamente en rizosferas, los actinomicetos colonizan todo tipo de sustratos en los ecosistemas más diversos incluyendo desde ambientes marinos (Mincer *et al.*, 2002) o desérticos (Dewedar *et al.*, 1979; Takahashi y Omura, 2003) a ecosistemas extremófilos (Mevs *et al.*, 2000; Basilio *et al.*, 2003). Comparten su hábitat con otras bacterias y hongos, con los que compiten por la escasez de nutrientes y producen una gran diversidad de compuestos, en muchos casos como respuesta a diferentes tipos de estímulos y estrés (Williams, *et al.*, 1972; Williams, *et al.*, 1983a; Jensen, *et al.*, 1991; Hopwood, 2003; Davies y Ryan, 2011). Su metabolismo es extraordinariamente rico y está frecuentemente acompañado de la producción de metabolitos secundarios de una gran diversidad química que se ha postulado juegan un importante papel en el mantenimiento, señalización y colonización del hábitat microbiano (McCarthy y Williams, 1992; Sanglier, *et al.*, 1996; Horan, 1999). Ha sido uno de los grupos más intensamente utilizados por la industria farmacéutica al ser una rica fuente de metabolitos secundarios.

El desarrollo de la morfología de las colonias de actinomicetos distingue a estos microorganismos de la mayoría de las demás bacterias. Se trata de un proceso multicelular que conduce a la diferenciación con formación de estructuras organizadas. La mayoría de las colonias de actinomicetos se originan a partir de esporas u otros propágulos asociados a partículas de tierra. El crecimiento comienza con la elongación y ramificación de las hifas vegetativas sobre la superficie y dentro del medio sólido y continúa con el desarrollo del micelio aéreo que normalmente coincide con el inicio de la producción de metabolitos secundarios que se prolonga durante la maduración del cultivo. Existe una serie de factores que influyen sobre la producción del micelio aéreo como son la composición del medio y la temperatura de incubación (Williams *et al.*, 1983a). La distinción entre el micelio vegetativo y el aéreo no se basa únicamente en su localización sino que se debe a que ambos son diferentes morfológica, estructural y fisiológicamente. El crecimiento en forma de micelio aéreo es poco frecuente en organismos procariotas y puede representar una adaptación al medio terrestre. Durante el desarrollo del micelio aéreo, el micelio vegetativo sufre una fragmentación y lisis que coincide con el desarrollo de las hifas aéreas, de forma que no se produce un cambio neto en el peso seco de la colonia, pues los compuestos presentes en el micelio vegetativo son utilizados como nutrientes por el micelio aéreo. A medida que este último se desarrolla, los compuestos del micelio vegetativo migran desde la base de la colonia hacia la región superior. Se ha propuesto que la producción de antibióticos por los actinomicetos sirve para prevenir la invasión del micelio vegetativo lisado por bacterias (Chater y Merrick, 1979). Hay que señalar que, a nivel molecular, tanto la expresión de metabolitos secundarios como el desarrollo morfológico, están altamente regulados por complejas cascadas de señalización controladas por diferentes familias de proteínas reguladoras, que se encuentran en muchos casos exclusivamente en actinomicetos (Bibb, 2005; Bush *et al.*, 2013)

1.2.1. Importancia de los actinomicetos: su metabolismo secundario.

La alta variabilidad morfológica y metabólica de los actinomicetos puede considerarse como una estrategia de adaptación a un entorno que cambia continuamente (Gräfe, 1988). El polimorfismo de los actinomicetos se correlaciona normalmente con la formación de una gran variedad de metabolitos secundarios. Dos tercios de los metabolitos secundarios activos aislados de microorganismos proceden de actinomicetos (Bérdy, 1995)

y 2005), siendo los estreptomicetos los responsables de más del 80% de estos. Su formación es una característica inherente al desarrollo del cultivo productor y se inicia, o es más eficiente, durante algunas etapas concretas del desarrollo. La expresión de los genes implicados en la producción de metabolitos secundarios está muy regulada durante el ciclo celular. La conservación de unas rutas metabólicas tan largas y costosas sólo se justifica si los compuestos producidos juegan algún papel esencial o beneficioso para la célula (Gräfe, 1988). La idea generalmente más aceptada es que el metabolismo secundario podría conferir una ventaja selectiva a la cepa productora, a pesar de que hasta la fecha sólo se ha podido atribuir una función definida a unos pocos metabolitos secundarios.

La importancia de los actinomicetos como productores de metabolitos secundarios se debe a su capacidad de sintetizar una gran variedad de compuestos con aplicación terapéutica como agentes antitumorales, antagonistas de receptores e inmunomoduladores. Esta amplia variedad de moléculas se puede clasificar en grandes familias estructurales como son las actinomicinas, los compuestos relacionados con aminoácidos, las ansamicinas, los antibióticos aminoglicosídicos, los β -lactámicos, las lactonas, los macrólidos, los antibióticos nucleosídicos, los antibióticos peptídicos, los polienos, los poliéteres, las quinonas, las tetraciclinas y otros compuestos naturales (Tabla 1) (Sanglier *et al.*, 1993; Demain, 1999; Walsh *et al.*, 2003; Bérdy, 2005; Newman y Cragg, 2007 y 2012; Peláez, F. y Genilloud, O., 2009; Singh *et al.*, 2010; Blunt *et al.*, 2014).

La búsqueda de nuevos antibióticos a partir de los metabolitos secundarios ha sido la investigación que más auge tuvo en el último siglo. Desde el descubrimiento de la actinomicina en 1940 se ha demostrado que los antibióticos se biosintetizan a través de rutas relacionadas con el metabolismo de azúcares, siquimato, acetato/malonato, nucleósidos, mevalonato, aminoácidos, péptidos ribosomales y no-ribosomales, a la vez que otras rutas compuestas (Walsh, 2003). Entre ellos se encuentran los aminoglicósidos que incluyen sustancias tan conocidas como la estreptomicina, la neomicina, y la gentamicina. A su vez, las ansamicinas (rifamicinas, estreptovaricinas y maitanisinoideas) constituyen una familia de antibióticos bactericidas y citotóxicos de entre los cuales la rifampicina constituye el tratamiento más efectivo que se conoce contra la tuberculosis. Las mitomicinas y en particular la mitomicina C, también tienen importancia clínica por su capacidad para tratar ciertos carcinomas y para prevenir la recurrencia del cáncer. Respecto a los antibióticos β -lactámicos, desde que en 1962 se descubrió la producción de penicilina N (sinematina B) por un estreptomiceto, se han descrito muchos tipos de compuestos β -lactámicos y derivados (penams, cefems, carbapenems, clavams y β -lactámicos monocíclicos) tanto en cultivos de actinomicetos como en otros procariotas. Del mismo modo se pueden citar antibióticos de amplio espectro como el cloranfenicol (cloromicetina) o los antibióticos macrólidos (Strohl, 1999; Clardy *et al.*, 2006; Walsh y Wencewicz, 2014).

Aunque los metabolitos secundarios pueden agruparse en distintas familias estructurales, se ha observado que no hay una correlación entre éstas y los datos filogenéticos, sino que cepas de la misma especie pueden no compartir la síntesis y a su vez, cepas muy distantes filogenéticamente son capaces de producir el mismo metabolito (Genilloud *et al.*, 2011).

La necesidad de definir un sistema taxonómico estable para los actinomicetos, que permita la identificación eficiente de nuevas especies y de las cepas productoras, ha determinado una rápida evolución de la taxonomía, desde el sistema taxonómico clásico, basado en caracteres fenotípicos, hasta la taxonomía polifásica actual, basada en gran medida en la taxonomía molecular.

Tabla 1: Productos naturales producidos por actinomicetos, comercializados o en desarrollo para su uso en medicina o veterinaria.

PK, poliquétido; NRP, péptido de síntesis no ribosomal; AG, aminoglicósido.

Clase estructural	Subclase	Compuesto	Clase terapéutica	Diana / Mecanismo de acción	Estructura principal	Organismo productor
β-Lactámicos	Cefalosporinas	Cefoxitina	Antibacteriano	síntesis de péptidoglicano	NRP	<i>Amycolatopsis lactamdurans</i> NRRL 3802
		Ácido clavulánico	Antibacteriano	síntesis de péptidoglicano	NRP	<i>Streptomyces clavuligerus</i>
	Carbapenems	Tienamicina	Antibacteriano	síntesis de péptidoglicano	NRP	<i>Streptomyces cattleya</i>
	Monobactamas	Nocardinas	Antibacteriano	síntesis de péptidoglicano	NRP	<i>Nocardia uniformis</i> ATCC 21806
Aminoglicósidos		Gentamicina	Antibacteriano	Síntesis de proteínas	AG	<i>Micromonospora purpurea</i> ATCC 15835
		Estreptomycin	Antibacteriano	Síntesis de proteínas	AG	<i>Streptomyces griseus</i> ATCC 23345
		Neomicina	Antibacteriano	Síntesis de proteínas	AG	<i>Streptomyces fradiae</i>
		Kanamicina	Antibacteriano	Síntesis de proteínas	AG	<i>Streptomyces kanamycetius</i> DSM 40500
		Tobramicina	Antibacteriano	Síntesis de proteínas	AG	<i>Streptomyces tenebrarius</i> DSM 40477
Macrólidos		Eritromicina	Antibacteriano	Síntesis de proteínas	PK	<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338
	Estreptograminas A (macrolactonas)	Virginiamicina-M	Antibacteriano	Síntesis de proteínas	PK	<i>Streptomyces virginiae</i> MAFF10-06014
	Estreptograminas A (macrolactonas)	Pristinamicina II	Antibacteriano	Síntesis de proteínas	PK	<i>Streptomyces pristinaespiralis</i> DSM 40338
	Estreptograminas A (macrolactonas)	Madumicina	Antibacteriano	Síntesis de proteínas	PK	<i>Streptomyces parvulus</i>
	Estreptograminas A (macrolactonas)	Griseoviridina	Antibacteriano	Síntesis de proteínas	PK	<i>Streptomyces griseoviridis</i>
		Rapamicina	Inmunosupresor / Antitumoral	Inhibición de IL-2 / FKBP	PK	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> NRRL 5491
		FK506 (Tacrolimus)	Inmunosupresor	Inhibición de IL-2 / FKBP	PK	<i>Streptomyces tsukubaensis</i> ATCC 53770
		Avermectina	Antiparasitario	Hiperpolarización de la membrana de neuronas	PK	<i>Streptomyces avermitilis</i> NRRL 8165
	Efomicinas	Elaiofilinas	Antiparasitario / Antiinflamatorio		PK	<i>Streptomyces violaceoniger</i> DSM4137
		Fluvirucinas	Antiparasitario			<i>Nonomuraea turkmeniaca</i> MA7364
	Polienos	Anfotericina B	Antifúngico	Ionóforo / Unión a esteroides de la membrana plasmática	PK	<i>Streptomyces nodosus</i> ATCC 14899
	Polienos	Nistatina	Antifúngico	Ionóforo / Unión a esteroides de la membrana plasmática	PK	<i>Streptomyces noursei</i> ATCC 11455

Clase estructural	Subclase	Compuesto	Clase terapéutica	Diana / Mecanismo de acción	Estructura principal	Organismo productor
Aromáticos	Antraciclina	Tetraciclina	Antibacteriano	Síntesis de proteínas	PK	<i>Streptomyces aureofaciens</i> DSM 40127
		Oxitetraciclina	Antibacteriano	Síntesis de proteínas	PK	<i>Streptomyces rimosus</i>
		Daunorubicina	Antitumoral	Replicación del ADN / Topoisomerasa II	PK	<i>Streptomyces peucetius</i> ATCC 27952
	Antraciclina	Doxorubicina	Antitumoral	Replicación del ADN / Topoisomerasa II	PK	<i>Streptomyces peucetius</i> ATCC 27952
		Mitomicina	Antitumoral	Inhibición de la síntesis de ADN	PK	<i>Streptomyces caespitosus</i>
		Mitramicina	Antitumoral	Inhibición de la síntesis de ARN y de proteínas	PK	<i>Streptomyces argillaceus</i> ATCC 12956
Oligosacáridos		Everninomicinas	Antibacteriano	Síntesis de proteínas		<i>Micromonospora carbonacea subsp. africana</i> ATCC 27115
		Lincomicina	Antibacteriano	Síntesis de proteínas		<i>Streptomyces lincolnensis</i>
Glicopéptidos	Glico-lipo-depsipéptido	Vancomicina	Antibacteriano	síntesis de péptidoglicano	NRP	<i>Amycolatopsis orientalis</i> ATCC 43491
		Teicoplanina	Antibacteriano	síntesis de péptidoglicano	NRP	<i>Actinoplanes teichomyceticus</i> ATCC 31121
		A-40926	Antibacteriano	síntesis de péptidoglicano	NRP	<i>Nonomurea</i> sp.
		Balhimicina	Antibacteriano	síntesis de péptidoglicano	NRP	<i>Amycolatopsis balhimicina</i>
		Ramoplanina	Antibacteriano	síntesis de péptidoglicano	NRP	<i>Actinoplanes</i> sp. ATCC 33076
		Enduracidinas	Antibacteriano	síntesis de péptidoglicano	NRP	<i>Streptomyces fungicidicus</i>
		Janiemicinas	Antibacteriano	síntesis de péptidoglicano	NRP	<i>Streptomyces macrosporeus</i>
		Cloroeremomicina	Antibacteriano	síntesis de péptidoglicano	NRP	<i>Amycolatopsis orientalis</i> NRRL 18098
		Mannopectimicinas	Antibacteriano	síntesis de péptidoglicano	NRP	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> LL-AC98
		Bleomicinas	Antitumoral	Degradación del ADN	NRP/PK	<i>Streptomyces verticillus</i> ATCC 15003
Lipopéptidos		Daptomicina	Antibacteriano	Membrana plasmática / síntesis de péptidoglicano	NRP	<i>Streptomyces roseosporus</i>
		Friulimicina	Antibacteriano	síntesis de péptidoglicano	NRP	<i>Actinoplanes friuliensis</i> DSM 7358
		Arilomicinas	Antibacteriano	Bloqueo de la secreción de proteínas / Spas I	NRP	<i>Streptomyces</i> sp. Tü 6075
Tiopéptidos	Tiazolilpéptido	GE2270A	Antibacteriano	Síntesis de proteínas		<i>Planobispora rosea</i> ATCC 53773
	Tiazolilpéptido	Nocatiacina	Antibacteriano	Síntesis de proteínas		<i>Amycolatopsis fastidiosa</i>
	Tiazolilpéptido	Tioestreptona	Antibacteriano	Síntesis de proteínas		<i>Streptomyces azureus</i>

Clase estructural	Subclase	Compuesto	Clase terapéutica	Diana / Mecanismo de acción	Estructura principal	Organismo productor
	Tiazolilpéptido	Tiazomicina	Antibacteriano	Síntesis de proteínas		<i>Amycolatopsis fastidiosa</i>
	Tiazolilpéptido	Philipimicina	Antibacteriano	Síntesis de proteínas		<i>Actinoplanes phillipinensis</i> MA7347
	Tiazolilpéptido	Kocurina	Antibacteriano	Síntesis de proteínas		<i>Kocuria</i> sp.
	Tiazolilpéptido-poliquétido	Leinamicina	Antibacteriano / Antitumoral	Replicación del ADN / Alquilante del ADN	NRP/PK	<i>Streptomyces atroolivaceus</i> S-140
	Péptido cíclico	Equinomicina	Antitumoral	Inhibidor de la transcripción / Intercalante del ADN		<i>Streptomyces equinatus</i>
	Tripéptido	Actinonina	Antibacteriano / Antitumoral	PDF (péptido deformilasa)		<i>Streptomyces</i> sp.
		Tiocoralina	Antitumoral	Replicación del ADN	NRP	<i>Micromonospora marina</i>
	Fosfonopéptidos	Fosfomicina	Antibacteriano	síntesis de péptidoglicano		<i>Streptomyces wedmorensis</i> / <i>Streptomyces fradiae</i> / <i>Streptomyces viridochromogenes</i>
Otros péptidos	Estreptograminas B (hexadepsipéptidos cíclicos)	Virginiamicina-S	Antibacteriano	Síntesis de proteínas	PK	<i>Streptomyces virginiae</i> MAFF10-06014
	Estreptograminas B (hexadepsipéptidos cíclicos)	Pristinamicina I	Antibacteriano	Síntesis de proteínas	PK	<i>Streptomyces pristinaespiralis</i> DSM 40338
	Uridil-péptidos	Liposidomicinas	Antibacteriano	síntesis de péptidoglicano		<i>Streptomyces griseosporus</i>
	Uridil-péptidos	Mureidomicinas	Antibacteriano	síntesis de péptidoglicano		<i>Streptomyces flavidovirens</i>
	Uridil-péptidos	Muraymicinas	Antibacteriano	síntesis de péptidoglicano		<i>Streptomyces</i> sp.
	Acildepsipeptidolactonas		Antibacteriano	Procesos de degradación celular / ClpP		<i>Streptomyces hawaiiensis</i> NRRL 15010
	Péptido lactonas	Actinomicina	Antitumoral	Inhibidor de la transcripción	NRP	<i>Streptomyces antibioticus</i>
Derivados de la ruta del shikimato	Ansamicinas (benzoquinonas)	Ansatrienina	Antitumoral	Inhibe actividad ATPasa de la Hsp90	PK	<i>Streptomyces collinus</i> Tu1892
	Ansamicinas (benzoquinonas)	Geldanamicina	Antitumoral	Inhibe actividad ATPasa de la Hsp90	PK	<i>Streptomyces hygroscopicus</i> subsp. <i>geldanus</i> NRRL 3602
	Ansamicinas	Rifamicinas	Antibacteriano	Síntesis de ARN (ARNm y ARNr) / ARN polimerasa	PK	<i>Amycolatopsis rifamycinica</i>
Alcaloide	Indolocarbazol	Rebecamicina	Antitumoral	Replicación del ADN / Inhibidor de la Topoisomerasa I		<i>Lechevalieria aerocolonigenes</i>

Clase estructural	Subclase	Compuesto	Clase terapéutica	Diana / Mecanismo de acción	Estructura principal	Organismo productor
Otros	Indolocarbazol	Staurosporina	Antitumoral	Replicación del ADN / Inhibidor de protein-quinasas		<i>Nocardiosis sp.</i>
		Kibdelomicina	Antibacteriano	Replicación del ADN / Inhibidor de la Topoisomerasa II		<i>Kibdelosporangium sp.</i> MA7385
		Lucensimicinas	Antibacteriano	Síntesis de proteínas		<i>Streptomyces lucensis</i> MA7349
		Okilactomicinas	Antibacteriano	Síntesis de proteínas		<i>Streptomyces scabrissporus</i>
		Platencina	Antibacteriano	Síntesis de ácidos grasos		<i>Streptomyces platensis</i> MA 7339
		Platensimicina	Antibacteriano	Síntesis de ácidos grasos		<i>Streptomyces platensis</i> MA 7327
	Fenicoles	Cloranfenicol	Antibacteriano	Síntesis de proteínas		<i>Streptomyces venezuelae</i>
	Aminocumarinas	Novobiocina	Antibacteriano	Inhibidor ADN girasa		<i>Streptomyces niveus</i>
	Nucleósido	Tunicamcina	Antibacteriano	síntesis de péptidoglicano / síntesis de glicoproteínas		<i>Streptomyces lysosuprificus</i> / <i>Streptomyces griseus subsp. griseus</i> / <i>Streptomyces chartreusis</i>
	Nucleósido	Nikkomicinas	Antifúngico / Insecticida	Inhibidor de la quitín sintasa		<i>Streptomyces tendae</i> Tü 901
	Poliéteres	Monensina	Antiparasitario		PK	<i>Streptomyces cinnamonensis</i>
	Poliquétido policíclico	Abyssomicinas	Antibacteriano	Inhibidor de la ruta de PABA	PK	<i>Verrucosipora maris</i> AB-18-032
	Enediinas	Calicheamicinas	Antitumoral	Replicación del ADN / Intercalante del ADN	PK	<i>Micromonospora echinospora</i>
	Enediinas	Esperamicinas	Antitumoral	Replicación del ADN / Intercalante del ADN	PK	<i>Actinomadura verrucosospora</i>
	Enediinas	Maduropeptina	Antitumoral	Replicación del ADN / Intercalante del ADN	PK	<i>Actinomadura madurae</i>
	Ácidos hidroxámicos	Tricostatina A	Antitumoral	Histona deacetilasa (HDAC)		<i>Streptomyces hygroscopicus</i>
	Ciclopropilindoles	Duocarmicinas	Antitumoral	Replicación del ADN / Intercalante del ADN		<i>Streptomyces spp.</i>
	Dibenzodiazepinona	ECO-4601	Antitumoral	Unión a receptores periféricos de benzodicepinas		<i>Micromonospora sp.</i>
	Lipo β -Lactona	Lipstatina	Antiobesidad	Inhibición de las lipasas pancreáticas	PK	<i>Streptomyces toxytricini</i>
	Poliquétido glicosídico	ECO-0501	Antibacteriano	Actúa sobre la membrana o la pared celular	PK	<i>Amycolatopsis orientalis</i> ATCC 43491
		Ácido actinoplánico	Antitumoral	Prenilación de la proteína Ras / FPTase		<i>Actinoplanes sp.</i> ATCC 55532

Clase estructural	Subclase	Compuesto	Clase terapéutica	Diana / Mecanismo de acción	Estructura principal	Organismo productor
		Ácido actinoplánico	Antitumoral	Prenilación de la proteína Ras / FPTase		<i>Streptomyces sp.</i> ATCC 55550
		ECO-02301	Antifúngico		PK	<i>Streptomyces aizunensis</i> NRRL B-11277
		Elsamicina	Antitumoral	Replicación del ADN / Topoisomerasa II		Actinomiceto no identificado
		Espinosinas	Acaricida		PK	<i>Saccharopolyspora spinosa</i>
		Tiacumicinas	Antibacteriano	Inhibición de la síntesis de ARN		<i>Dactylosporangium aurantiacum subsp. hamdenensis</i> NRRL 18085

1.3. Biodiversidad microbiana y bioprospección.

Uno de los principales factores en la búsqueda de nuevos metabolitos es aumentar la biodiversidad de las cepas estudiadas e identificar nuevos microorganismos que produzcan nuevos compuestos de interés, reorientando los esfuerzos de bioprospección a otros entornos y hábitats menos explorados. Los datos de análisis metagenómicos han demostrado que sólo el 0,5-1% de las especies de bacterias existentes y el 5% de las especies de hongos se han cultivado (Bull, 2004). En este sentido, son de gran interés el desarrollo de nuevos métodos que permitan el aislamiento de microorganismos no cultivados con anterioridad a partir de medios pobres en nutrientes unido a largos tiempos de incubación, dilución hasta la extinción, simulación del ecosistema y la comunicación célula-célula. (Demain, 2004).

La necesidad de seguir explorando la biodiversidad plantea evaluar el procedimiento más adecuado para afrontar su búsqueda y la prospección de fuentes para el aislamiento de microorganismos. Existen diferentes aproximaciones al problema que proponen desde llevar a cabo un muestreo en un amplio número de diversos entornos en vez limitarse a un número de ellos (Kuo y Garrity, 2002).

Una idea muy extendida en ecología microbiana es que “todo está en todas partes y que el medioambiente selecciona” (Beijerinck, 1913; Baas-Becking, 1934; Dykhuizen, 1998; Cho y Tiedje, 2000; De Wit y Bouvier, 2006; O'Malley, 2007), con lo que la mayoría de las especies de bacterias estarían ampliamente distribuidas y que los diferentes ecosistemas seleccionarían aquellas mejor adaptadas. Sin embargo, otras evidencias apoyan que diferentes ecosistemas albergan poblaciones microbianas únicas (Eardly *et al.*, 1990; Castenholz, 1996; Garcia-Pichel *et al.*, 1996; Fulthorpe *et al.*, 1998; Staley y Gosink, 1999; Cho y Tiedje, 2000; Finlay, 2002; Selje *et al.*, 2004; Escobar-Páramo *et al.*, 2005; Boenigk *et al.*, 2006; Wawrik *et al.*, 2007). La distribución global de especies microbianas puede covariar en función de los parámetros físicos, tales como el clima y la luz. En algunos estudios se ha observado que no hay una relación directa entre la diversidad microbiana y algunas de las características físicas y químicas del entorno, tales como la temperatura, la latitud, la precipitación, la proporción carbono-nitrógeno o la humedad, aunque la riqueza de especies estaba mayoritariamente ligada al tipo de ecosistema y al pH del suelo, indicando que ciertos parámetros, tales como la química del suelo y el contexto ecológico, afectan drásticamente a la distribución de las bacterias en el ambiente (Fierer y Jackson, 2006).

En el contexto anterior, hay que reseñar el trabajo llevado a cabo por Wawrik y colaboradores (2007) que determinaron la composición de las comunidades microbianas presentes en suelos de Norteamérica y de Asia Central demostrando que existen diferencias entre las comunidades de actinomicetos presentes en suelos con distinta localización geográfica, indicando que existen poblaciones únicas tanto en Norteamérica como en Asia Central. Los datos de este estudio sugieren que sólo una pequeña proporción de las poblaciones de actinomicetos y de genes de metabolitos secundarios en el medioambiente son cosmopolitas y que distintas poblaciones de actinomicetos pueden encontrarse en suelos recogidos en diferentes regiones del mundo. Similares resultados han obtenido Edlund y

colaboradores, (2011) con distintas cepas de la especie *Salinispora arenicola* recolectada en diferentes localizaciones geográficas concluyendo que subpoblaciones de *S. arenicola* son endémicas según las localizaciones. En consecuencia, sería conveniente muestrear en áreas remotas del globo para mejorar los esfuerzos de bioprospección que tengan como objetivo la selección de nuevas especies de actinomicetos.

1.3.1. Aislamiento de actinomicetos de muestras ambientales.

El trabajo pionero de Waksman no sólo demostró que los actinomicetos eran capaces de producir antibióticos útiles en medicina, sino que estimuló la búsqueda de nuevas cepas activas. Desde entonces se han aislado y analizado millones de cepas de actinomicetos en los laboratorios de investigación, principalmente de las compañías farmacéuticas, a la vez que se han desarrollado una amplia gama de medios de aislamiento que permitieron identificar y estudiar gran parte de las especies conocidas (Nolan y Cross, 1988). La definición de la composición de los medios de aislamiento es determinante para conseguir recuperar en cultivo la mayor diversidad microbiana de una muestra, evitando que predominen unas pocas especies de rápido crecimiento.

Los primeros métodos de aislamiento desarrollados hace décadas eran poco selectivos y favorecieron el aislamiento intensivo de cepas fácilmente cultivables de especies del género *Streptomyces*, el grupo mayoritario en cuanto al número de especies descritas entre los actinomicetos y uno de los taxones más prolíficos respecto a la producción de metabolitos secundarios. En décadas posteriores, se observó que otros géneros minoritarios también eran capaces de sintetizar nuevas moléculas y se desarrollaron otras estrategias de aislamiento para estas especies. De esta manera la aplicación de métodos específicos de aislamiento para otros géneros permitió comprobar que algunos de ellos, como los géneros *Micromonospora*, *Nocardia*, o *Actinoplanes*, antes considerados minoritarios, son en realidad muy numerosos y están muy extendidos en diferentes entornos (Nonomura y Ohara, 1971b). Posteriormente, se fueron desarrollando métodos específicos como pretratamientos de la muestra, medios de crecimiento especializados, largos tiempos de incubación que permiten el crecimiento de especies minoritarias como son los géneros *Actinomadura*, *Microbispora*, *Microtetraspora*, *Streptosporangium*, *Thermomonospora* o *Thermoactinomyces* entre muchos otros más (Nonomura y Ohara, 1971 a y b).

También se ha conseguido aumentar la selectividad de los medios de aislamiento al añadir concentraciones subinhibitorias de una amplia variedad de antibióticos que permiten inhibir selectivamente el crecimiento de otro tipo de bacterias competidoras. La superficie de una placa de aislamiento es un ambiente altamente competitivo donde los actinomicetos de crecimiento lento, presentes normalmente en las muestras de tierra en cantidades relativamente pequeñas, están en clara desventaja. La reducción del número de competidores, utilizando diferentes agentes antimicrobianos, ha permitido la identificación de nuevos taxones que no eran cultivados previamente o eran aislados con muy poca frecuencia.

Además del simple sistema de dilución seriada y plaqueo de las muestras sobre distintos medios de cultivo selectivos se pueden aplicar diferentes pretratamientos a las muestras con el fin de enriquecer el aislamiento en ciertas especies, inducir la germinación de las esporas, dispersar mejor los agregados celulares en la muestra, etc. El pretratamiento con extracto de levadura está descrito como un activador de la germinación de esporas de actinomicetos (Hayakawa y Nonomura, 1989). El pretratamiento de las muestras con este compuesto y con un detergente como el SDS permite reducir el número de bacterias unicelulares en las placas de aislamiento y se ha aplicado con éxito para el aislamiento general de actinomicetos.

Gran parte de las bacterias existentes en el suelo están adheridas a partículas de tierra (arcillas especialmente) mediante cargas iónicas a través de cationes polivalentes. Muchos microorganismos se unen también a las partículas de la matriz del suelo mediante polisacáridos. Estas agregaciones de las esporas o propágulos de actinomicetos a las partículas de tierra puede evitarse por pretratamiento de las muestras con resinas como Chelex 100 y deoxicolato que permiten una mejor dispersión de la muestra y la detección de organismos presentes en muy pequeño número tras concentración por centrifugación diferencial (Herron y Wellington, 1990).

Se han desarrollado ciertos pretratamientos, descritos por Hayakawa y colaboradores (1991a y b), que permiten el aislamiento selectivo de actinomicetos pertenecientes a la familia *Streptosporangiaceae* (principalmente de los géneros *Streptosporangium* y *Microbispora*) y que están basados en el diferente grado de resistencia de las esporas a agentes tóxicos para las células como el cloruro de bencetonio o el gluconato de clohexidina.

Otras estrategias de aislamiento están basadas en el conocimiento previo de la biología de los microorganismos que se quieren aislar y su comportamiento en el medioambiente. Este es el caso de las cepas pertenecientes a la familia *Micromonosporaceae* (*Actinoplanes*, *Dactylosporangium*, *Pilimelia*, etc) que suelen encontrarse frecuentemente cerca de zonas húmedas de ríos y lagos con abundante vegetación. Las esporas de dichos actinomicetos que se forman dentro de esporangios, resisten largos periodos de desecación y son liberadas tras la hidratación de los esporangios. Las esporas tienen la capacidad de desarrollar flagelos en presencia de agua y son fuertemente atraídas por gradientes de ciertas sustancias como KCl, aminoácidos, compuestos aromáticos y azúcares, siendo la γ -colidina la que produce una mayor respuesta quimiotáctica. Uno de los métodos de enriquecimiento en bacterias de estas especies está basado en esta propiedad y en la posibilidad de concentrar el número de esporas estableciendo gradientes de γ -colidina respecto al medio acuático (Palleroni, 1980; Hayakawa, 1991c). Posteriormente otro método describe un enriquecimiento selectivo en esporas móviles mediante una centrifugación selectiva de dicha fracción enriquecida (Hayakawa et al., 2000).

Todos estos pretratamientos se combinan normalmente con la utilización de un amplio número de medios de aislamiento muy pobres en nutrientes, sin fuentes de carbono, compuestos de extractos de tierra, sales, ácidos húmicos, de manera que los organismos de rápido crecimiento (*Streptomyces* en su mayoría) no agoten los pocos recursos existentes e

inhiban el crecimiento de los restantes microorganismos minoritarios en un ambiente altamente competitivo. La utilización combinada de diferentes métodos y medios de cultivo lleva a la generación de un promedio de 12 a 20 condiciones distintas para cada una de las muestras en estudio, lo que permite incrementar la explotación de la diversidad microbiológica que pueda contener.

En la práctica, el número de colonias viables de actinomicetos que se seleccionan en el laboratorio a partir de una muestra varía en función de las características de la misma, como pueden ser sus propiedades físico-químicas así como las características de su hábitat, geografía, altitud, ecología, etc. Aunque una mayoría de cultivos corresponden al género *Streptomyces*, también se aíslan muy frecuentemente cepas de los géneros *Micromonospora*, *Actinoplanes* y demás géneros relacionados, cepas de *Nocardia*, cepas de la familia *Pseudonocardiaceae* (*Pseudonocardia*, *Amycolatopsis*, *Saccharopolyspora*) y de las familias *Thermomonosporaceae* y *Streptosporangiaceae* (*Actinomadura*, *Microbispora*, *Streptosporangium*, *Planobispora*, *Microtetraspora*) (Embley, 1992; Lazzarini *et al.* 2000 y 2001; González *et al.*, 2005). Con menor frecuencia se identifican otros géneros minoritarios. Un gran número de cepas son estériles en cultivo o presentan micromorfologías no asociables a ningún género descrito, por lo que se tiene que utilizar herramientas alternativas quimiotaxonómicas y moleculares que permitan su identificación y distinción.

Dado que los actinomicetos pueden colonizar casi cualquier sustrato, el interés se ha dirigido hacia la utilización de nuevas fuentes de aislamiento y de otros nichos ecológicos, incluyendo muestras de agua dulce, muestras marinas y sus sedimentos, invertebrados marinos como esponjas, artrópodos, raíces y líquenes, con el objetivo de aislar nuevas cepas y de estudiar su potencial para producir nuevos metabolitos secundarios (Goodfellow y Haynes, 1984; Goodfellow y Williams, 1986; Fenical, 1993; Fiedler *et al.*, 2005; González *et al.*, 2005)

1.3.2. Los líquenes como fuente para el aislamiento de actinomicetos.

Los líquenes son una simbiosis mutualista estable que está formada por un hongo (el micobionte, generalmente un ascomiceto) y una microalga y/o una cianobacteria (el fotobionte) que se comportan como un organismo compuesto (Crittenden y Porter, 1991; Miao *et al.*, 2001). La mayoría de los hongos liquénicos forman una simbiosis en el líquen con un alga verde (*Chlorophyta*), solo un 10% con cianobacterias y un 3% con ambos tipos de organismos. Los líquenes se pueden considerar ecosistemas en miniatura donde la interacción entre las partes resulta en formas de vida y de comportamiento que no son las que tienen las partes por separado (Oksanen, 2006). Hasta la fecha, no se ha descrito ningún caso en el que un actinomiceto forme parte de la simbiosis de un líquen, aunque los actinomicetos, al igual que otras bacterias, son también capaces de formar asociaciones con varios organismos en ambientes naturales. Sin embargo, en condiciones de laboratorio se ha visto que el crecimiento mixto de cultivos de *Streptomyces filamentosus* y algas verdes produce la formación de una estructura parecida al talo de los líquenes (Zenova *et al.*, 1983; Kalakoutsii *et al.*, 1990; Kalakutskaya *et al.*, 1993).

Los líquenes son los primeros colonizadores de los hábitats terrestres y pueden crecer bajo condiciones muy diversas y a veces ambientes extremos. Por esta razón, presentan una amplia distribución mundial desde las regiones árticas a las tropicales y desde las llanuras hasta las más altas montañas (hasta 7.400m) (Ahmadjian, 1993). Son capaces de crecer como “parches” dispersos sobre piedras, rocas, afloramientos, suelos poco desarrollados como los de las tierras áridas, o como epifitos sobre troncos de árboles y arbustos. También son capaces de biodeteriorar las piedras en un relativamente corto espacio de tiempo (Crittenden y Porter, 1991; Muller, 2001). A pesar del enorme rango de ambientes donde se han adaptado, la mayoría de los líquenes son sensibles a cambios en sus condiciones del entorno y difícilmente pueden crecer fuera de su ambiente (Miao *et al.*, 2001). Los hábitats son típicamente pobres de nutrientes y a menudo están sometidos a frecuentes sequías. Muchos de los organismos que viven en medioambientes extremos producen compuestos únicos que los protegen del estrés físico o de ataques biológicos durante su lento crecimiento.

Los líquenes producen diferentes clases de metabolitos secundarios que pueden inhibir el crecimiento de microorganismos y plantas vasculares y les protegen de la radiación ultravioleta. (Lee y Kim, 2000). Hasta la fecha se han identificado más de 800 metabolitos producidos por líquenes. Algunos compuestos pueden ser sintetizados por el hongo o el alga *per se*, mientras que otros son exclusivamente producidos por la acción conjunta de ambos miembros del liquen (Muller, 2001), aunque en muchos casos no está claro quién es el organismo responsable de la síntesis del compuesto. Por ejemplo, se ha visto que extractos del liquen *Umbilicaria esculenta* presentan una actividad inhibitoria de la β -glucosidasa. El compuesto responsable de la actividad es 1-dexinojirimicina, el cual también es producido por especies de *Streptomyces* y por especies de la planta *Morus* sp. (Lee y Kim, 2000). Los metabolitos sintetizados por los líquenes ejercen una amplia variedad de acciones biológicas y aunque su papel en la simbiosis del liquen es todavía incierta, las actividades biológicas de muchas de estas sustancias sugieren que funcionan como defensa frente al ataque de diversos patógenos. Por ejemplo, muchas clases de sustancias producidas por líquenes tienen actividades antimicrobianas, como el ácido lecanórico y el ácido vulpínico, que podrían prevenir a los líquenes de infecciones producidas por ciertos microorganismos durante su lento crecimiento y larga vida.

Además, los líquenes se han venido usando durante siglos en medicina tradicional por ser productores de numerosos compuestos con actividades antibióticas, antivirales, antitumorales, analgésicas y antipiréticas (Muller, 2001). Uno de los metabolitos más potentes es el ácido úsnico, un derivado fenólico que se encuentra ampliamente distribuido entre las especies de líquenes. El ácido úsnico extraído de las especies de líquenes *Cladonia* spp., y sus derivados sintéticos se han comercializado como agentes antifúngicos y antibacterianos, principalmente como uso tópico. Los compuestos producidos por los líquenes, entre los que destacan el ácido úsnico y otros compuestos fenólicos (dépsidos, depsidonas, xantonas, etc.) pueden ser determinantes o influir en la comunidad microbiana que habita en el liquen (Boustie y Grube, 2005). Debido a este último factor, se ha visto que en líquenes productores de ácido úsnico la abundancia de bacterias es menor (Cardinale *et al.*, 2008).

Aunque tanto los integrantes de la simbiosis de los líquenes como la diversidad de metabolitos con actividad biológica que producen se han descrito extensamente (Huneck, 1999; Muller, 2001; Kosanic y Rankovic, 2015), se sabe poco sin embargo sobre la diversidad de la comunidad microbiana que pueden albergar. Varios ejemplos de hongos habitantes de líquenes en especies fruticulosas o la presencia de biofilms microbianos en líquenes saxícolas han demostrado la existencia de un microhábitat que aporta la humedad, los nutrientes y la protección adecuada para el desarrollo de otras poblaciones de microorganismos en ambientes extremos (Petrini, *et al.*, 1990; de los Rios *et al.*, 2002). Una de las asociaciones microbianas endolíticas más ampliamente estudiadas ha sido las comunidades criptolíticas de los desiertos antárticos dominados por líquenes. Su estudio mediante técnicas moleculares ha mostrado la gran diversidad de microorganismos presente en estos ecosistemas, donde varios filotipos de *Actinobacteria* han sido descritos, además de otros taxones (de la Torre, 2003), mientras que otros estudios han descrito el aislamiento de diferentes especies de actinomicetos del género *Micromonospora* de estos entornos ecológicos (Hirsch, *et al.*, 2004).

Entre los factores que determinan la diversidad de la comunidad bacteriana que habita los líquenes está, en primer lugar, la especie de liquen. Grube y colaboradores (2009) demostraron que algunos grupos bacterianos asociados a los líquenes, como por ejemplo las *Alphaproteobacteria*, presentaban patrones específicos de la especie del liquen y que estas bacterias pueden ser parte fundamental de la simbiosis liquénica. Mushegian y colaboradores (2011) también observaron que las comunidades de bacterias asociadas al liquen eran claramente distintas de las que habitaban en los suelos cercanos, sugiriendo que los líquenes albergan comunidades de bacterias que no son una simple extensión de las que se encuentran en los suelos circundantes. Otros autores han observado que diferentes especies de líquenes localizadas espacialmente próximas en un mismo entorno, contienen distintas comunidades bacterianas y parece que la especie del liquen es por sí misma el factor más importante que determina la composición de la comunidad bacteriana aunque algunos grupos de bacterias están ampliamente presentes en diferentes especies de líquenes incluso aunque estén muy alejados geográficamente (Bates *et al.*, 2010 y 2011). Aunque las *Alphaproteobacteria* son el grupo dominante asociado a los líquenes, especialmente en los líquenes que tienen algas verdes como fotobiontes (Hodkinson *et al.*, 2012), también se han aislado otros muchos grupos de bacterias asociados a los líquenes, como *Actinobacteria* y *Acidobacteria*, detectándose incluso otros taxones no aislados todavía (Selbmann *et al.*, 2010; Bates *et al.*, 2011; Pankratov, 2012). Hodkinson y colaboradores (2012) concluyeron que la composición de las comunidades bacterianas mayoritarias está significativamente correlacionada con el tipo del fotobionte y del micobionte ya que observaron que líquenes con diferentes micobiontes albergan diferentes comunidades microbianas y que el tipo de fotobionte que forma parte de la asociación liquénica, bien sean cianobacterias (ciano-líquenes) o algas verdes (cloro-líquenes), da lugar a ecologías diferentes en base a las diferencias en la composición y concentración de carbono y nitrógeno, lo cual puede dar lugar, presumiblemente, a comunidades microbianas diferentes. Estos autores también observaron que otros factores que determinan las comunidades bacterianas de los líquenes son las diferencias geográficas a gran escala y las diferencias climáticas. Así pues, los datos indican que incluso los líquenes de un mismo hábitat albergan comunidades bacterianas distintas, determinadas según la especie del liquen (Cardinale *et al.*, 2006; Cardinale *et al.*,

2008; Grube y Berg, 2009; Grube *et al.*, 2009; Selbmann *et al.*, 2010; Bates *et al.*, 2011; Mushegian *et al.*, 2011; Cardinale *et al.*, 2012a; Cardinale *et al.*, 2012b; Printzen *et al.*, 2012).

Como hemos mencionado, otro de los factores que más influyen en la composición de las comunidades bacterianas es la distancia geográfica y las diferencias climáticas (Cardinale *et al.*, 2006; Grube y Berg, 2009; Grube *et al.*, 2009; Bates *et al.*, 2011; Cardinale *et al.*, 2012a; Cardinale *et al.*, 2012b; Hodkinson *et al.*, 2012; Printzen *et al.*, 2012). En el trabajo de Hodkinson y colaboradores (2012) comentado anteriormente, estos autores vieron que la diversidad de las comunidades bacterianas presentes en líquenes recolectados en Costa Rica y Alaska era diferente y que podía explicarse por la mayor abundancia de ciano-líquenes en las muestras de Costa Rica y de cloro-líquenes entre los de Alaska. Selbmann y colaboradores (2010) estudiaron la diversidad de las bacterias cultivables de líquenes antárticos, siendo *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Pseudomonas* y *Deinococcus-Thermus* los grupos más representados, en vez de las *Alphaproteobacteria* descritas en otros hábitats. Printzen y colaboradores (2012) han estudiado las comunidades de *Alphaproteobacteria* en poblaciones geográficamente distantes del liquen *Cetraria aculeata*, incluyendo regiones polares, alpinas y zonas templadas, concluyendo que influyen más las diferencias climáticas que la distancia geográfica por sí misma y que en particular, las comunidades de ambos polos son más parecidas entre sí que con las de comunidades de zonas templadas.

Hasta la fecha, existen pocas publicaciones de actinomicetos aislados de líquenes que produzcan compuestos bioactivos (Boustie *et al.*, 2011). Davies y colaboradores (2005) describieron la producción de uncialamicina, que reveló ser un nuevo compuesto tipo enediinas, por una cepa de *Streptomyces* aislada de un liquen (*Cladonia uncialis*) recolectado en la Columbia Británica (Canadá). También se han descrito otros compuestos producidos por otras cepas de *Streptomyces* aisladas de líquenes, como coumabiocinas A-F (nuevas aminocoumarinas) o nuevas anguciclinas y nuevas butenolidas (Cheenpracha *et al.*, 2010; Motohashi *et al.*, 2010).

Como vemos, los microorganismos que habitan o que forman parte de la asociación simbiótica del liquen, generan microambientes químicos únicos, y también participando en el reciclaje de nutrientes así como en prevenir la depredación del hospedador por medio de la producción de moléculas bioactivas (Genilloud *et al.*, 2011). Por tanto, a la vista de estos resultados, vemos que los parámetros físicos y químicos del entorno del liquen son únicos y pueden conducir a la evolución de formas de vida que podrían también producir metabolitos con estructuras químicas novedosas.

Aunque la mayoría de los trabajos sobre las comunidades bacterianas que habitan los líquenes indican que las poblaciones más abundantes pertenecen al grupo de las *Alphaproteobacteria* (Cardinale *et al.*, 2008; Grube y Berg, 2009; Grube *et al.*, 2009; Bates *et al.*, 2011; Cardinale *et al.*, 2012b; Hodkinson *et al.*, 2012; Pankratov, 2012; Printzen *et al.*, 2012), también se ha descrito la presencia de actinobacterias (Cardinale *et al.*, 2006; Cardinale *et al.*, 2008; Motohashi *et al.*, 2010; Pankratov, 2012), especialmente en líquenes antárticos (Selbmann *et al.*, 2010), aunque en proporciones inferiores al 10%.

1.3.3. Diversidad microbiana.

El término “diversidad biológica” fue acuñado por Elliot Norse y colaboradores (1986) y puede aplicarse para definir la diversidad según el nivel de complejidad, bien a nivel genético para definir la diversidad entre especies, a nivel de especie para determinar el número de especies, y a nivel ecológico para estudiar la diversidad de la comunidad.

La medida más sencilla de la biodiversidad es la *riqueza de especies*, es decir, el número de especies presentes en un área o hábitat determinado. La riqueza de especies, también conocida como diversidad- α , define la riqueza de un conjunto de organismos que potencialmente interactúan; de forma parecida, la diversidad- γ mide la diversidad dentro de un área pero relacionada con un área mayor como un bioma o bioregión. La diversidad- β es una medida de la diversidad entre áreas y puede expresarse como un índice de similitud. Otra medida de la biodiversidad, con mayor información ecológica, es la *abundancia de especies*. La *rareza* de una especie viene dada según el tamaño de la población local (grande o pequeña), especificidad del hábitat (amplio o estrecho) y por el tamaño geográfico (grande o pequeño).

El concepto de “especie” es un tema de discusión recurrente en taxonomía. Las especies son entidades prácticas para las que los límites pueden variar dependiendo del concepto aplicado, bien sea éste biológico, fenético, filogenético o evolutivo (Hull, 1997).

El término “especie” puede emplearse para referirse a una categoría taxonómica que se corresponde a un concepto abstracto desprovisto de cualquier localización espacio-temporal o bien a una entidad colectiva concreta formada por organismos reales localizados en el espacio y en el tiempo, es decir, un taxón (Van Regenmortel, 1997). Los taxones, nombrados como clases naturales de organismos, son el resultado de dos procesos: (i) los procesos evolutivos que han originado la diversidad biológica y (ii) la capacidad mental humana que reconoce y da nombre a los patrones recurrentes (Hey, 2001). La delimitación de las especies se ha optimizado por medio del desarrollo de métodos microbiológicos que revelan tanto las propiedades genómicas como fenotípicas de los procariotas.

Las primeras definiciones de especies bacterianas se fundamentaban con frecuencia en grupos monotéticos que se reconocían por un conjunto único y exclusivo de características que son suficientes y necesarias para la definición del grupo y que son invariables (Goodfellow *et al.*, 1997b). La rigidez de esta definición tuvo como consecuencia que algunas cepas que variaban en caracteres clave no podían identificarse como miembros de un taxón existente. Esto dio lugar a menudo a confusiones en la nomenclatura en donde una especie dada podía clasificarse simultáneamente bajo varios nombres diferentes, como es el caso de la sobreespeciación del género *Streptomyces* (Goodfellow *et al.*, 1997b). Con el desarrollo de la taxonomía numérica (Sneath y Sokal, 1973) el concepto de especie evolucionó abandonando la aproximación monotética hacia una politética o fenética, en donde las especies estaban delimitadas en base a un gran conjunto de caracteres independientes, cada uno de los cuales puede ocurrir también fuera de una clase determinada y por tanto, no son

exclusivos de esa clase (Van Regenmortel, 1997). El éxito para delimitar una especie en tales términos es directamente dependiente de la cantidad de caracteres que se usen. Generalmente se acepta que una especie de procariotas es “un grupo de cepas que tienen un alto grado de similitud global y que difieren considerablemente de los grupos de cepas emparentadas con respecto a muchas características independientes” o “una colección de cepas que muestran un alto grado de similitud global, comparados con otros grupos de cepas relacionados” (Colwell *et al.*, 1995). La taxonomía numérica es un sistema fenético basado en similitudes fenotípicas globales que establece unidades taxonómicas operacionales (OTUs).

Una mayoría de análisis fenéticos están basados en datos fenotípicos, en gran parte en propiedades bioquímicas. El fenotipo de las bacterias se estudia extensamente con frecuencia mediante el uso de marcadores quimiotaxonómicos tales como los perfiles de ácidos grasos, poliaminas y quinonas (Goodfellow y Minnikin, 1985). El objetivo de la clasificación fenética es crear conjuntos de cepas agrupadas, establecidas como una jerarquía de especies y géneros en base a sus similitudes globales (Young, 2001). Los datos fenotípicos incluyen tanto datos de un solo carácter como datos de caracteres múltiples.

El estudio de Williams y colaboradores (1983b y 1983c) fue un hito de la taxonomía numérica y de la sistemática de *Streptomyces*. En dicho estudio, examinaron 162 caracteres que comprendían características morfológicas, pigmentación, actividad antimicrobiana, resistencia a antibióticos, la utilización de compuestos orgánicos como única fuente de carbono y de nitrógeno, y la realización de una serie de pruebas bioquímicas, degradativas y de crecimiento. Posteriormente, Kämpfer y Kroppenstedt (1991) actualizaron el sistema de clasificación de Williams y colaboradores ampliando a 329 el número de caracteres fisiológicos a identificar e incluyendo un mayor número de cepas de *Streptomyces* (Goodfellow *et al.* 1992)

La inclusión de características genómicas al conjunto de caracteres usados para delimitar las especies ha impulsado importantes cambios y ha influido a la hora de definir una especie (Stackebrandt *et al.*, 2002). En particular, la adopción de la hibridación del ADN genómico total, como un método estándar para la definición de una especie, permitió correlacionar los valores de hibridación del ADN y los datos quimiotaxonómicos y fenotípicos (Goodfellow *et al.*, 1997b). Se estableció que los organismos que tienen valores de reasociación de ADN-ADN del 70% o menores, y/o un ΔT_m de 5°C o menos deben considerarse especies distintas, si además está corroborado por alguna característica fenotípica (Stackebrandt y Gobel, 1994).

Un punto de inflexión en la sistemática bacteriana ocurrió al introducir la secuencia del gen 16S ARNr en los análisis cladísticos para delinear árboles genealógicos (filogenéticos) (Woese, 1987). En el caso de los microorganismos, las inferencias filogenéticas dependen casi por completo de la evidencia indirecta suministrada por el análisis de los datos de secuencia que se considera expresan tasas de cambio genético (mutación de las bases nucleotídicas) con el tiempo, usándose para inferir relaciones históricas fiables. Al contrario que la taxonomía numérica, la sistemática filogenética (cladística) revela, o intenta revelar, relaciones evolutivas dentro de un grupo de organismos y utiliza la composición en bases del

ADN, homología del ADN, *fingerprinting* genómico y secuenciación de genes para establecer tales relaciones.

La secuencia del gen 16S ARNr carece de poder de resolución a nivel de especies de procariotas, tal y como se definen por la similitud del ADN-ADN, pero permite la identificación de la posición filogenética de nuevos organismos (Ludwig y Schleifer, 1994; Stackebrandt y Gobel, 1994; Mehling *et al.*, 1995a). Uno de los parámetros indispensables que debe suministrarse en las descripciones de nuevas especies es el de la secuencia completa del gen 16S ARNr (Stackebrandt *et al.*, 2002).

La definición de especie en procariotas definida anteriormente puede lograrse por la aplicación simultánea de un conjunto de técnicas dirigidas al conocimiento de la diversidad de las cepas bajo estudio, siguiendo la denominada aproximación polifásica (Colwell, 1970; Vandamme *et al.*, 1996). El camino más adecuado para definir una especie es la aplicación de los resultados de los análisis fenéticos, filogenéticos y genotípicos (Rosselló-Mora y Amann, 2001; Staley, 2006; Tindall *et al.*, 2010). Una especie es una categoría que delimita un grupo de cepas individuales genómicamente coherente que comparten un alto grado de similitud en muchos caracteres independientes, probadas comparativamente bajo altas condiciones estándar (Stackebrandt *et al.*, 2002).

La aproximación polifásica.

Hoy en día, existe un gran número de técnicas para la identificación y clasificación de procariotas. La clase de información que cada técnica produce está directamente relacionada con su poder de resolución, y el uso correcto de la información es esencial para garantizar la adecuada clasificación de un taxón. Es por tanto de primordial importancia entender a qué nivel suministran información estos métodos y darse cuenta de su complejidad técnica, es decir, de la cantidad de trabajo, tiempo y coste económico que requieren.

Los datos genómicos se obtienen de los ácidos nucleicos (ADN y ARN) mediante diversos métodos, algunos de ellos ya clásicos como la determinación del contenido en porcentaje de G+C, la hibridación ADN-ADN o el análisis de la secuencia del gen 16S ARNr, o por métodos de caracterización basados en el ADN tales como RFLP, LFRP (low-frequency restriction pattern analysis), RAPD, AFLP, Rep-PCR y ARDRA entre otros.

La información del fenotipo se obtiene por el uso de análisis fenotípicos clásicos incluyendo los estudios quimiotaxonómicos. Entre los análisis fenotípicos clásicos tenemos la morfología (macro y micromorfología) y caracteres fisiológicos y bioquímicos. Los marcadores quimiotaxonómicos hacen referencia a aquellos constituyentes químicos de las células que son útiles para caracterizar a los procariotas, incluyendo componentes tales como la composición de la pared celular, ácidos grasos celulares, quinonas isoprenoides y poliaminas. En las **Figuras 1 y 2** tenemos una representación esquemática de varias técnicas utilizadas en una aproximación polifásica así como el nivel de resolución taxonómica de las mismas (basado en Vandamme *et al.*, 1996).

Por tanto, el término de especie debe usarse sólo cuando la caracterización se ha realizado con fundamentos polifásicos, mientras que términos como OTUs y filotipo deben usarse para entidades basadas en la fenética o en la secuencia de genes, respectivamente.

Figura 1. Representación esquemática de varios componentes celulares y técnicas con información fenotípica y genotípica utilizadas en una aproximación polifásica (basado en Vandamme *et al.*, 1996).

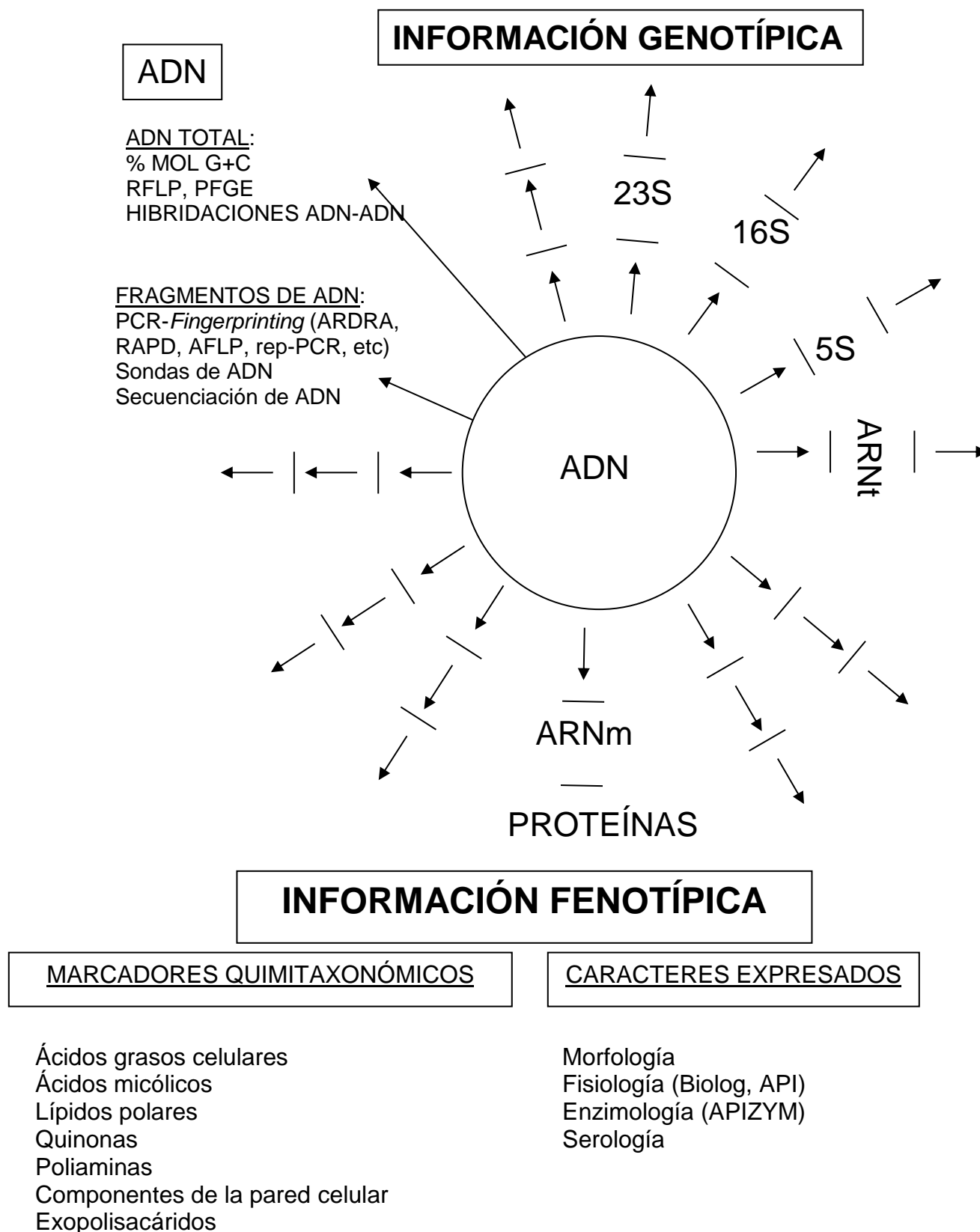
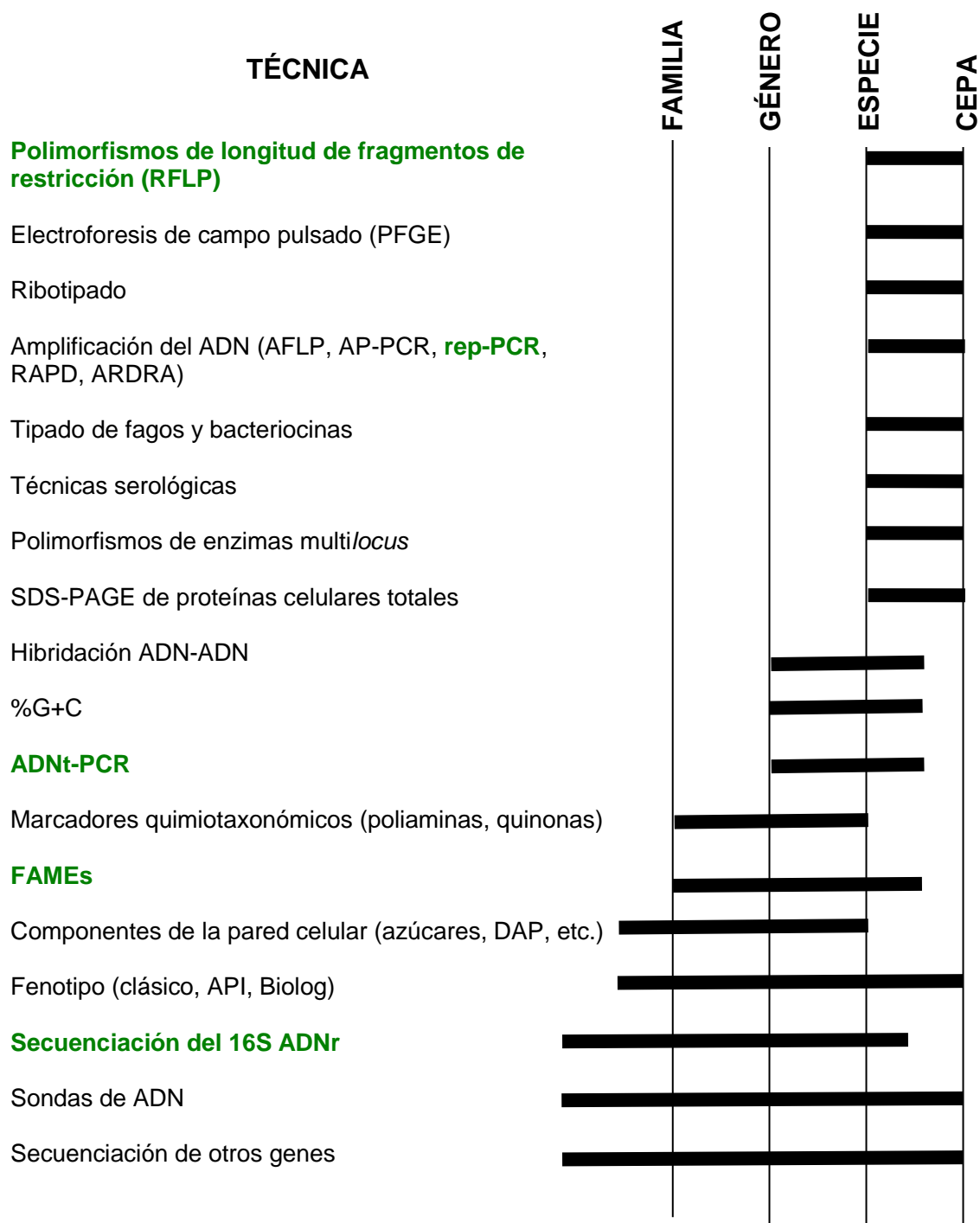


Figura 2. Nivel de resolución taxonómica de diferentes técnicas de caracterización (Vandamme *et al.*, 1996).



1.4. Clasificación e identificación de los actinomicetos.

Como ya se ha expuesto anteriormente, la sistemática bacteriana ha sufrido una enorme evolución en los últimos 50 años, convirtiéndose en una disciplina que se desarrolla rápidamente, en parte en función del desarrollo de nuevas técnicas, lo que hace cambiar la perspectiva sobre la caracterización, identificación y, por tanto, clasificación de las bacterias. Esta evolución en la sistemática bacteriana se debe a la introducción de nuevas metodologías aplicadas a la taxonomía como son los métodos analíticos, la taxonomía numérica y posteriormente métodos moleculares ([Lilburn y Garrity, 2004](#); [Oren y Garrity, 2013](#))

1.4.1. Quimiotaxonomía.

La morfología fue originalmente la forma más rápida y sencilla de identificación de cepas aunque en función de este único criterio resultaba difícil una clasificación de los actinomicetos en grupos coherentes. Dichos caracteres incluyen no sólo características celulares (forma, tamaño, endosporas, flagelos, tinción de Gram,...) y de la colonia (la estructura del micelio, tanto aéreo como vegetativo, color, dimensiones, forma, textura,...), sino también otras estructuras diferenciales, el tipo de esporas y esporangios, así como la presencia de otras estructuras poco comunes como los *synnemata*, los esporangios multiloculares o los esclerocios ([Lechevalier, 1989](#)).

Los métodos fenotípicos comprenden todos aquellos métodos que no están dirigidos hacia el ADN o el ARN y por lo tanto incluyen las técnicas quimiotaxonómicas. La introducción de la quimiotaxonomía se considera como uno de los hitos en el desarrollo de la moderna clasificación bacteriana. La quimiotaxonomía está basada en la determinación de distintos componentes químicos de la estructura de la célula que sirven para clasificar las bacterias, mediante la aplicación de métodos analíticos. Existen diversos métodos químicos para el análisis de estos componentes estructurales de las células que se desarrollan a la vez que lo hacen los métodos de análisis con técnicas más sofisticadas y precisas como es el caso de la espectrometría de masas.

La determinación de la composición en lípidos y componentes de la pared celular son clave en la sistemática bacteriana ya que son sintetizados por sistemas enzimáticos altamente regulados y son suficientemente estables para utilizarse con criterios taxonómicos ([Komagata y Suzuki, 1988](#)). Dicha composición cambia en ciertas ocasiones como respuesta a las condiciones de cultivo y el periodo de incubación, por lo que siempre se refieren a condiciones de cultivo estandarizadas. Estos cambios deben tenerse en cuenta cuando se utilizan datos químicos en la sistemática bacteriana.

1.4.1.1. Análisis de la composición de lípidos.

La determinación de la composición de los lípidos estructurales de bacterias (ácidos grasos, ácidos micólicos, lípidos polares, y las quinonas isoprenoides) es ampliamente empleada y ha demostrado su utilidad en sistemática bacteriana. Entre ellos, los ácidos grasos y los lípidos polares de membrana son considerados los de mayor aplicación, dado

que, en condiciones estandarizadas, proporcionan parámetros comparables entre cepas. Estos compuestos son relativamente fáciles de determinar y presentan una variación cualitativa y cuantitativa con un gran poder de discriminación ([Embley y Wait, 1994](#)).

a.- Ácidos grasos celulares.

Los ácidos grasos celulares son los componentes lipídicos celulares con longitud de la cadena de carbonos entre 9 y 20 átomos. Los lípidos de las membranas celulares son la principal fuente de ácidos grasos de las células microbianas, es decir, los glicolípidos y fosfolípidos, así como los ácidos grasos constituyentes de los lipopolisacáridos pero no incluye los ácidos micólicos de cadena larga (entre 24 y 90 átomos de carbono) o las quinonas isoprenoides ([Welch, 1991](#)).

Se han identificado más de 300 ácidos grasos diferentes. La variabilidad en la longitud de cadena, la presencia y posición de insaturaciones y de grupos sustituyentes han demostrado ser de una gran utilidad en la caracterización de los distintos grupos taxonómicos bacterianos. La composición de los ésteres metílicos de los ácidos grasos es un parámetro estable siempre y cuando se utilicen condiciones de cultivo altamente estandarizadas.

El contenido en ácidos grasos de todos los lípidos está determinado por el tipo de ruta biosintética de una determinada especie. La mayoría de las bacterias sintetizan ácidos grasos con longitudes de cadena de 10 a 19 átomos de carbono y los ácidos grasos que prevalecen son aquéllos con 16 ó 18 átomos de carbono. En particular, el ácido graso saturado de 16 átomos de carbono, el ácido hexadecanoico, está altamente conservado en los procariotas. La variación de ácidos grasos que hace que un microorganismo tenga una composición de ácidos grasos distintiva incluye diferencias cuantitativas así como diferencias cualitativas, dependiendo la misma según las condiciones de cultivo.

El perfil habitual presenta entre 5 y 15 ácidos grasos en cantidades significativas, aunque hay géneros que presentan pocos ácidos grasos como *Rochalimaea* o por el contrario tienen más de 20 ácidos grasos como es el caso del género *Xanthomonas*. Las bacterias contienen ácidos grasos que son únicos, es decir, que no se encuentran normalmente en los eucariotas. Por ejemplo, ácidos grasos ramificados o que contienen ciclopropano son característicos, respectivamente de muchas bacterias gram-positivas y gram-negativas, pero sin embargo no están presentes en los hongos. Por el contrario, los ácidos grasos poliinsaturados que se encuentran en organismos superiores tienden a estar ausentes en bacterias aerobias. Generalmente, las bacterias gram-negativas tienen una proporción más alta de ácidos grasos saturados y monoinsaturados con una cadena con un número par de átomos de carbono que las bacterias gram-positivas. Sin embargo, éstas últimas tienden a tener ácidos grasos saturados y ramificados con una cadena con un número impar de átomos de carbono y cantidades más bajas de ácidos grasos saturados y lineales.

Como se ha mencionado antes, los patrones de ácidos grasos presentes en un microorganismo están determinados por rutas biosintéticas específicas. En concreto, en la clase "*Actinobacteria*", los ácidos grasos están definidos claramente por dos tipos de rutas

(**Tabla 2**). Los productos de una de estas rutas incluyen ácidos grasos saturados e insaturados (**tipo 1a**), así como los ácidos grasos con ciclopropano (**tipo 1c**) y los ácidos grasos ramificados del tipo 10-metil (**tipo 1b**) derivados de los compuestos insaturados. La segunda ruta da lugar a ácidos grasos con ramificaciones terminales (**tipo 2**), como por ejemplo, los ácidos grasos ramificados tipo *iso*- y *anteiso*-. Por último, existen miembros de un grupo de organismos (**tipo 3**) que son capaces de sintetizar ambos tipos de ácidos grasos con cadenas ramificadas, tanto con ramificaciones terminales como del tipo 10-metil. Además de esto, existen también diferencias en la longitud de cadena de los ácidos grasos sintetizados. Por otro lado, la mayoría de los actinomicetos carecen de ácidos grasos hidroxilados aunque existen algunas excepciones a esta regla como puede verse en la **Tabla 2**. (Kroppenstedt, 1985) En la mayoría de los casos en los que se han detectado ácidos grasos hidroxilados en actinomicetos, se ha visto con posterioridad que la cepa estaba mal clasificada o que su *status* taxonómico no era claro (O'Donnell *et al.* 1982; Collins *et al.*, 1983).

El valor del análisis de los ácidos grasos ha quedado demostrado en numerosas ocasiones por su aplicación a diversos grupos taxonómicos de bacterias como rizobios (Tighe *et al.*, 2000), cianobacterias (Caudales *et al.*, 2000), *Xanthomonas* (Vauterin *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1993a; Vauterin *et al.*, 1996) o en la clasificación de miembros de la clase “*Actinobacteria*” como *Streptomyces* (Bowers *et al.*, 1996; Ndowora *et al.*, 1996), *Micromonospora* sp. (Goodfellow *et al.*, 1990; Kroppenstedt *et al.*, 2005; Trujillo *et al.*, 2005; Trujillo *et al.*, 2006; Trujillo *et al.*, 2007; Carro-García *et al.*, 2010; Carro *et al.*, 2012), *Actinoplanes* (Goodfellow *et al.*, 1990; Garrity *et al.*, 1996) y la familia *Thermomonosporaceae* (Zhang *et al.*, 2001), entre otros, lo que ha permitido distinguir organismos con morfologías similares.

Tabla 2: Patrones de ácidos grasos entre los miembros de la clase “*Actinobacteria*” (adaptada de Kroppenstedt, 1985).

Géneros	Tipo ¹	Saturados	Insaturados	iso		anteiso	10-metil		2-OH	ciclopropano
				14/16/18	15/17	15/17	17	18 (TBSA)		
<i>Corynebacterium</i> ²	1a	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-
<i>Nocardia</i> ³	1b	+++	+++	-	-	-	-	++	-	-
<i>Actinomyces</i> ⁴	1c	+++	+++	-	-	-	-	-	-	++
<i>Saccharomonospora</i>	2a	++	+	+++	+	(+)	-	-	++	-
<i>Thermoactinomyces</i>	2b	(+)	+	++	+++	+	-	-	-	-
<i>Streptomyces</i> ⁵	2c	+	(v)	+++	+	+++	-	-	+	-
<i>Actinoplanes</i> ⁶	2d	+	+	+++	+++	+++	-	-	-	-
<i>Actinomadura</i>	3a	+++	++	+++	(+)	(+)	(+)	+++	-	-
<i>Micromonospora</i>	3b	+	+	+++	+++	++	++	(+)	-	-
<i>Microtetraspora, Nonomuraea</i>	3c	+	+	++	+	+	+++	(+)	++	-
<i>Nocardioopsis</i>	3d	+	+	+++	++	+++	(+)	+++	-	-
<i>Amycolata</i>	3e	+	+	+++		+	+	-	-	-
<i>Amycolatopsis</i>	3f	+	++	+++		+	+	-	+	-
<i>Saccharothrix</i>	3g	+	+	+++		+	+	-	+	-

Notas:

+++ 15-25%, ++ 5-15%, + 1-5%, (v), variable

¹ Tipos de ácidos grasos según Kroppenstedt (1985).² Excluyendo *Corynebacterium bovis*.³ Incluyendo a *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* y *Tsukamurella*.⁴ Contiene ácidos grasos tipo ciclopropano.⁵ La presencia de ácidos grasos hidroxilados es específica de especie entre los *Streptomyces*.⁶ Sólo aquellos géneros de *Actinoplanes* que contienen xilosa en su pared celular.

Aplicación de los ácidos grasos en quimiotaxonomía.

La determinación de la composición de los ácidos grasos mediante cromatografía de gases ha demostrado ser un procedimiento de gran valor para una rápida identificación y clasificación de una amplia gama de bacterias. La aplicación de esta técnica fue empleada por primera vez por Abel y colaboradores (1963) quienes postularon que tanto las similitudes como las diferencias en la composición química proporcionan una base para la clasificación de los microorganismos dado que las diferencias de composición química están dirigidas por relaciones naturales o evolutivas. En particular, los ésteres metílicos de los ácidos grasos analizados mediante la cromatografía de gases proporcionan unos patrones cromatográficos característicos (Abel *et al.*, 1963). Desde entonces, el método se ha ido utilizando cada vez más a la vez que se iban introduciendo nuevas mejoras técnicas en el mismo. Por ejemplo, la introducción por Moss de las columnas capilares de sílice fundida (Moss *et al.*, 1980; Moss 1981; Moss y Núñez-Montiel, 1982) permitió un aumento en la resolución y en la eficiencia de separación de los componentes pobremente resueltos como son los isómeros posicionales de ácidos con la misma longitud de cadena de carbonos. Muchas especies de bacterias contienen ácidos grasos ramificados, los cuales generalmente son de dos tipos: la forma *iso*, en la que un grupo metilo se localiza en el penúltimo átomo de carbono, y la forma *anteiso*, en la que el grupo metilo se sitúa en el antepenúltimo átomo de carbono. Con una columna capilar, las formas *iso* y *anteiso* se resuelven completamente. Otra mejora adicional en el protocolo de extracción de los ácidos grasos fue el lavado con hidróxido sódico para mejorar la detección de los hidroxiácidos, introducido por Miller (Miller, 1982). Por último, el protocolo de Sasser introduce algunas modificaciones en el proceso de derivatización y extracción de los ácidos grasos, siendo este método el más utilizado hoy en día (Sasser *et al.*, 1984; Sasser, 1990a; Sasser, 1990b; Sasser, 1993; Yang *et al.*, 1993a).

El análisis de los ácidos grasos celulares totales se utiliza con mucha frecuencia en la caracterización de poblaciones de bacterias ya que es un método rápido y altamente automatizado que permite analizar muchas cepas en un primer cribado. Es importante determinar el nivel resolutivo de la técnica según el taxón que se investigue. Para algunos géneros, el análisis de ácidos grasos permite la diferenciación e identificación de especies individuales e incluso de subespecies, mientras que en otros casos hay especies diferentes que presentan perfiles de ácidos grasos idénticos. Las especies de un mismo género suelen tener los mismos ácidos grasos sencillos, aunque puede haber diferencias significativas en cuanto a las cantidades relativas de componentes individuales. Es importante reseñar nuevamente que la extracción de los ácidos grasos debe realizarse a partir de cepas cultivadas en condiciones estandarizadas para obtener resultados reproducibles, ya que dependiendo del taxón estudiado, la composición de los ácidos grasos puede ser muy sensible a la edad del cultivo. Por ejemplo, se ha visto en muchos casos que la fase logarítmica temprana de crecimiento es la fase menos recomendable para obtener unos perfiles reproducibles (Vauterin *et al.*, 1996).

Además del valor taxonómico que tiene por sí mismo el análisis de ácidos grasos, números estudios han demostrado que existe una gran correlación entre el análisis de ácidos

grasos y otros métodos de análisis muy utilizados para la identificación y caracterización de cepas. Por ejemplo, algunos estudios han demostrado que existe un claro paralelismo entre las relaciones de los microorganismos según sus patrones de ácidos grasos y las relaciones filogenéticas basadas en la similitud de secuencia del gen ribosomal 16S, siendo muy congruentes los resultados obtenidos de los análisis de *clusters* (Guckert *et al.*, 1991; Kohring *et al.*, 1994; Tighe *et al.*, 2000). En el caso del género *Streptomyces*, los estudios de Lanoot y colaboradores, (2002) han demostrado que los resultados de FAMES correlacionan bien con los obtenidos para el análisis de proteínas celulares totales mediante SDS-PAGE y que ambos métodos son coherentes con los agrupamientos basados en la homología de sus ADN.

b.- Otros lípidos con aplicaciones taxonómicas.

Los ácidos micólicos, 3- hidroxí ácidos grasos de alto peso molecular de cadena larga (20-90 carbonos), con una ramificación alquilo en la posición 2 (2-alkuil-3-hidroxí ácidos grasos) están ampliamente distribuidos en miembros de los géneros *Corynebacterium*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* y *Tsukamurella* y pueden usarse con fines taxonómicos

Los fosfolípidos están ampliamente distribuidos en actinomicetos y su presencia es útil en sistemática bacteriana. Lechevalier y colaboradores (1977), examinaron los fosfolípidos de los actinomicetos y los clasificaron en cinco grupos (PI, PII, PIII, PIV y PV), dependiendo de la presencia o ausencia de fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilmetiletanolamina (PME) y otros lípidos con glucosamina (GLU).

Las quinonas isoprenoides están presentes en las membranas citoplasmáticas de la mayoría de procariotas jugando un papel importante en el transporte electrónico, la fosforilación oxidativa y, posiblemente, en el transporte activo. Se pueden distinguir dos grupos estructurales, las naftoquinonas y las benzoquinonas. Las primeras, a su vez, se pueden subdividir en filoquinonas y en menaquinonas. La gran variabilidad de las cadenas laterales puede utilizarse para caracterizar las bacterias a distintos niveles taxonómicos. Los actinomicetos contienen únicamente menaquinonas, con una gran variación entre taxones. La composición en quinonas isoprenoides es típica para cada género y por ello se utiliza como criterio de clasificación bacteriana.

1.4.1.2. **Análisis de los constituyentes de la pared celular.**

La determinación de la composición de la pared celular es un elemento esencial en la clasificación quimiotaxonómica de las bacterias gram-positivas al contener distintos tipos de péptidoglicano que puede ser específico de género o de especie. Entre los componentes de la pared celular se estudian los isómeros del ácido diaminopimélico, la composición de azúcares y los ácidos teicoicos.

a.- Isómeros del ácido diaminopimélico.

En quimiotaxonomía existen dos parámetros claves en la identificación de los actinomicetos: el isómero del ácido diaminopimélico presente en la pared celular ([Becker et al., 1965](#)), y los azúcares de diagnóstico presentes en el hidrolizado de la célula entera ([Lechevalier y Lechevalier, 1970](#)).

El péptidoglicano está formado por glicano, un polímero en el que se alternan unidades de N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico y por un péptido que une la cadena de glicano. La variación del péptido proporciona una información taxonómica, especialmente en los actinomicetos. Por el contrario, el glicano del peptidoglicano no presenta tanta variación. El ácido 2,6-diaminopimélico (DAP) está ampliamente distribuido y las bacterias contienen generalmente sólo uno de los isómeros, la forma LL o la forma meso (DL). La determinación del tipo de isómero del DAP, a partir de células enteras, constituye una de las determinaciones clave en el análisis de la pared celular de bacterias gram positivas, ya que permite distinguir entre géneros que presentan *meso*-DAP y otros géneros, como *Streptomyces*, que contienen LL-DAP.

b.- Composición de azúcares de células enteras.

La composición en azúcares suele proporcionar una información útil para la clasificación e identificación de actinomicetos. La pared celular bacteriana contiene otros tipos de azúcares, además de la glucosamina y el ácido murámico del péptidoglicano. El patrón de azúcares obtenido a partir de células enteras divide a los actinomicetos que contienen *meso*-DAP en cuatro tipos. El tipo A se caracteriza por la presencia de arabinosa y galactosa sin xilosa. El tipo B tiene madurosa y no presenta arabinosa ni xilosa. El tipo C no tiene azúcares característicos, mientras que en las cepas de tipo D se encuentran xilosa y arabinosa. La presencia de madurosa es un marcador importante para algunos géneros de actinomicetos, como por ejemplo los géneros *Actinomadura*, *Streptosporangium* y *Microbispora* ([Lechevalier y Lechevalier, 1970](#)).

1.4.1.3. **Análisis de proteínas celulares totales.**

Numerosos estudios han demostrado que una alta similitud del perfil de proteínas suele generalmente corresponder y ser indicativo de una alta homología de hibridación del ADN. Por tanto, una gran ventaja de esta técnica es que, una vez que dicha correlación se ha establecido para un determinado taxón, puede reemplazar, al menos en parte, a los experimentos de hibridación del ADN ([Vauterin et al., 1992](#); [Lanoot et al., 2002](#)). Como en el caso de los ácidos grasos, las cepas deben crecerse en condiciones altamente estandarizadas, permitiendo de este modo la comparación de los perfiles normalizados de proteínas y como consecuencia la creación de bases de datos para la identificación de cepas ([Pot et al., 1994](#)). Tradicionalmente, la comparación de los patrones de proteínas celulares

totales se ha realizado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) en condiciones altamente estandarizadas.

Análisis mediante MALDI-TOF

Entre los análisis quimiotaxonómicos para la identificación de microorganismos está cobrando cada vez más importancia el análisis de los perfiles de proteínas mediante MALDI-TOF, debido a la especificidad y el rápido análisis. Al contrario que los métodos basados en el ADN, la detección de los espectros de masas no requiere secuencias genómicas o de proteínas de referencia. Además, la espectrometría de masas MALDI-TOF aplicada en microbiología permite analizar diferentes biomarcadores en microorganismos intactos, convirtiéndose en una importante herramienta aplicada a las ciencias biológicas y al diagnóstico y sustituyendo muchos de los métodos convencionales para la clasificación e identificación de especies de bacterias (Claydon *et al.*, 1996; Fenselau y Demirev, 2001; Bright *et al.*, 2002).

La espectrometría de masas MALDI-TOF permite registrar iones biomarcadores en un amplio rango de m/z (lípidos, proteínas, ADN, ARN). Sin embargo, las proteínas proporcionan los biomarcadores más característicos de los microorganismos, utilizándose los de un rango de 4000-20000 Da para realizar el *fingerprinting* de microorganismos. En *E.coli* todas las proteínas proceden del interior de la célula y el 50% son proteínas ribosomales (Pineda *et al.*, 2003).

La técnica del MALDI-TOF requiere una pequeña muestra (<1 ul, una única colonia con un límite de detección de 103 células) depositada sobre una placa de análisis antes de la adición de la matriz y el análisis. Además, el láser asegura la desorción/ionización de sólo las proteínas intactas protonadas. La separación de las masas se realiza mediante el análisis de TOF que es un método rápido y el espectro de masas se realiza en su mayoría por la detección de iones positivos (Maier y Kostrzewa, 2007).

Los patrones de masas de proteínas (la señal y la intensidad de las masas) detectados por espectrometría de masas mediante MALDI-TOF pueden analizarse eficazmente en grandes números y alto procesamiento usando métodos de “clustering” jerárquicos en poco tiempo (Sauer *et al.*, 2008; Petersen *et al.*, 2009). En los espectros de masas obtenidos usando células enteras, lo habitual es detectar hasta 30 picos, predominantemente en el rango de masas moleculares de 4.000 a 13.000 Da. Se ha visto que este número de picos es suficiente para la identificación de bacterias a nivel de género y especie para muchos patógenos bacterianos presentes en alimentos u otros patógenos de importancia clínica, tales como *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Yersinia*, y *Listeria* (Smole *et al.*, 2002; McElvania *et al.*, 2013; Balážová *et al.*, 2014), así como cepas de Actinobacterias (Verroken *et al.*, 2010; Hsueh *et al.*, 2014) y para evaluar la diversidad de cepas ambientales (Dieckmann *et al.*, 2005).

Una plataforma comercial para la clasificación e identificación de microorganismos basada en el análisis de perfiles de proteínas por medio de la espectrometría de masas

MALDI-TOF es la desarrollada por Bruker Daltonics (MALDI-TOF/Biotyper™). Esta plataforma analiza las muestras de forma automática e identifica los microorganismos por comparación de los perfiles de proteínas obtenidos con los de una base de datos que contiene más de 5600 cepas con perfiles de referencia (Maier y Kostrzewa, 2007; Mellmann *et al.*, 2008).

1.4.2. Caracterización molecular.

La taxonomía numérica ha sido el método más efectivo a la hora de establecer relaciones dentro de un mismo género. Sin embargo, la taxonomía basada en las propiedades químicas, morfológicas y fisiológicas dio como resultado la asignación de bacterias a grupos supragenéricos de los cuales se demostró posteriormente una composición heterogénea (Goodfellow, 1989). De hecho, fue sólo a partir de la introducción del análisis de ácidos nucleicos cuando la clasificación supragenérica fue posible.

Los métodos moleculares están basados en el análisis de las moléculas de ADN o ARN. La clasificación basada en relaciones entre genes presenta una serie de ventajas como son la estabilidad del sistema de clasificación, su eficacia como sistema de identificación y la obtención de información útil que permite evaluar cómo han evolucionado varios grupos de bacterias y establecer sus relaciones filogenéticas.

Las técnicas basadas en el genotipo, incluyen los experimentos de reasociación ADN-ADN, esencial para establecer el grado de relación entre las distintas cepas, y la determinación de la similitud entre las secuencias de ARNr y ADNr 16S, que revelan el grado de variación de las secuencias entre cepas a todos los niveles taxonómicos. Estas dos técnicas son fundamentales para caracterizar una nueva especie. Además, la determinación de la proporción de las bases del ADN (porcentaje de moles de G+C) es otra de las técnicas genotípicas utilizadas más ampliamente. Una de las aproximaciones que ha adquirido más relevancia en la taxonomía procariota es el *Multilocus Sequence Analysis* (MLSA), técnica derivada del *Multilocus Sequence Typing* (MLST) (Maiden *et al.*, 1998) utilizada primeramente para la caracterización de cepas en estudios epidemiológicos.

1.4.2.1. Reasociación de los ácidos nucleicos.

La hibridación de ADN, que estima la similitud de secuencias entre dos genomas completos diferentes, está reconocida como el método de referencia para establecer las relaciones “intra e interespecíficas”. En general, de acuerdo con la definición de Wayne y colaboradores (1987) se asume que las bacterias que pertenecen a una misma especie presentan valores de homología superiores al 70%, aunque el nivel exacto por debajo del cual se considera que los organismos pertenecen a distintas especies es variable teniendo que ser concordantes con esta definición los caracteres fenotípicos. Los experimentos de reasociación de ADN han permitido aclarar las relaciones entre varios géneros bacterianos (Schleifer y Stackebrandt, 1983; Labeda, 1992).

Las técnicas de hibridación presentan importantes desventajas y limitaciones porque son laboriosas y requieren grandes cantidades de ADN. Además, los datos de hibridación del ADN obtenidos en diferentes laboratorios no siempre correlacionan bien, debido en parte a la utilización de diferentes métodos con distintos resultados, con lo que no se puede establecer una base de datos en la que se puedan ir acumulando los datos de DDH ([Stackebrandt y Ebers, 2006](#); [Rosselló-Móra, 2006](#)). Además, la experiencia ha demostrado que existen serias dificultades a la hora de aplicar la regla del 70% de hibridación del ADN ([Ursing *et al.*, 1995](#); [Ramasamy *et al.*, 2014](#)).

En consecuencia, debido a las limitaciones y problemas que presenta la DDH, y teniendo en cuenta los avances en la secuenciación de genomas, se están evaluando otros métodos más sencillos y fiables que puedan utilizarse alternativamente ([Stackebrandt *et al.*, 2002](#); [Gevers *et al.*, 2005](#); [Ramasamy *et al.*, 2014](#)).

Se han propuesto numerosas alternativas que sustituyan a la DDH como el “patrón de oro” para delimitar las especies de procariotas, muchas de ellas basadas en los datos de la secuenciación completa de genomas. Entre éstas, se incluyen la identidad nucleotídica media (ANI) ([Konstantinidis y Tiedje, 2005](#); [Konstantinidis *et al.*, 2006](#)), la distancia filogenética del genoma BLAST (GBDP) ([Henz *et al.*, 2005](#)) y el máximo índice de coincidencia única (MUMi) ([Deloger *et al.*, 2009](#)). De estos, ANI es el que se ha utilizado más frecuentemente en lugar de la DDH para delimitar las especies ya que ANI representa una media de los valores de identidad/similitud entre regiones genómicas homólogas compartidas por dos genomas. En general, se acepta que valores de ANI del 95–96% equivalen al punto de corte del 70% de la DDH y que puede, por tanto, utilizarse para delimitar las especies ([Konstantinidis y Tiedje, 2005](#); [Konstantinidis *et al.*, 2006](#); [Rosselló-Móra, 2006](#); [Goris *et al.*, 2007](#); [Konstantinidis y Tiedje, 2007](#); [Richter y Rosselló-Móra, 2009](#); [Chun y Rainey, 2014](#); [Kim *et al.*, 2014](#); [Ramasamy *et al.*, 2014](#)).

1.4.2.2. Análisis del ARN ribosomal.

El principal punto de inflexión en la determinación de la evolución y filogenia de los procariotas llegó con la introducción de las técnicas de secuenciación del ARN ribosomal (ARNr). La utilización de las subunidades grandes del ARNr como fuentes tanto para la delineación de relaciones filogenéticas como para la identificación de taxones supuso una revolución dentro de la microbiología. El gen 16S ARNr es un marcador molecular eficaz con fines taxonómicos al ser universal, funcionalmente estable, altamente conservado y sujeto con poca frecuencia a transferencia génica horizontal (TGH) ([Fox *et al.*, 1980](#); [Woese *et al.*, 1985](#); [Fox y Stackebrandt, 1987](#); [Embley y Stackebrandt, 1994](#)). Todas estas características hacen que este gen se haya utilizado en el análisis comparativo de especies bacterianas haciendo que la filogenia basada en el ARNr sea representativa de la verdadera filogenia del organismo puesto que los cambios “no cronométricos” de secuencia, es decir, aquellos que son seleccionados y distorsionan el análisis filogenético, ocurren muy rara vez. Esto hace del ARNr un cronómetro molecular particularmente preciso ([Woese *et al.*, 1985 y 1987](#); [Hillis y Dixon, 1991](#)).

Sin embargo, el gen 16S ARNr también presenta algunas limitaciones como marcador taxonómico como son: (i) su alto grado de conservación en algunos géneros; (ii) la presencia de variaciones nucleotídicas entre las distintos operones presentes en un mismo genoma (Rainey *et al.*, 1996; Acinas *et al.*, 2004) y (iii) la posibilidad de que los genes 16S rRNA se hayan adquirido por TGH que puedan distorsionar las relaciones entre taxones en los árboles filogenéticos (Jain *et al.*, 1999).

A pesar de que se trata de moléculas altamente conservadas, la secuencia del gen 16S ADNr contiene seis regiones variables en las posiciones nucleotídicas 170-230, 430-580, 560-640, 790-830, 960-1020 y 1090-1130 del gen 16S ADNr de *Streptomyces ambofaciens* (Pernodet *et al.*, 1989). Tres de estas secuencias corresponden a las regiones α , β y γ descritas para el género *Streptomyces* (posiciones 170-230, 960-1020 y 1090-1120, respectivamente) (Stackebrandt *et al.*, 1991; Stackebrandt *et al.*, 1992). Estas regiones variables son útiles para el diseño de sondas específicas que pueden ser utilizadas para diferenciar géneros, especies e incluso subespecies. Debido a estas propiedades y al hecho de ser el gen que ha evolucionado más lentamente, el gen del ARNr 16S se ha establecido como elemento de referencia para identificar especies, géneros y familias de bacterias (Fox *et al.*, 1977; Amman *et al.*, 1995; Mehling *et al.*, 1995a).

No obstante, la igualdad de las secuencias del ARNr 16S puede no implicar necesariamente la igualdad de las especies. Por lo tanto, si bien las secuencias del ARNr 16S pueden ser utilizadas rutinariamente para distinguir y establecer relaciones entre géneros y especies bien definidas, en el caso de especies cuya divergencia es muy reciente estas diferencias puede que no sean reconocidas (Fox *et al.*, 1992).

1.4.2.3. Secuenciación del gen ribosomal 16S.

Los genes ARNr desempeñan una función vital para la célula y se considera que la evolución de esta región puede reflejar la evolución del organismo (Fox *et al.*, 1977; Woese, 1992). Por otra parte, está perfectamente documentado que las relaciones filogenéticas entre los organismos pueden inferirse a partir de la comparación de las secuencias de las moléculas de ARNr y de algunas de sus características firma. El hecho de que existan secuencias universales en la molécula de ARNr bacteriana nos permite clasificar organismos no-cultivados y realizar identificaciones filogenéticas y la detección *in situ* de células individuales sin ser cultivadas.

Stackebrandt y Goebel (1994) demostraron que, en general, aquellos organismos que tienen más del 97% de similitud del gen 16S ARNr pueden pertenecer a la misma especie y que la resolución del análisis de secuencia del 16S ARNr entre organismos muy cercanos es generalmente baja. Aunque no hay un punto de corte para identificar una especie según su valor de similitud del 16S ARNr, hay que decir que los organismos que presentan una similitud de secuencia menor del 97% 16S ARNr no tendrán una hibridación del ADN de más del 60%, independientemente del método de hibridación que se use. Así pues, el análisis de secuencia

del ARNr puede reemplazar a los estudios de hibridación de ADN como parte de la descripción de nuevas especies, siempre y cuando la similitud de secuencia sea menor del 97%. De hecho, cuando se propone una nueva especie, está generalmente aceptado que sólo es preciso realizar la DDH en aquellas parejas de cepas que tengan más de un 97% de similitud en la secuencia del gen 16S ARNr (Tindall *et al.*, 2010).

El valor de similitud de secuencia del gen 16S ARNr del 97% se ha usado como punto de corte para establecer nuevas especies (Stackebrandt y Goebel, 1994). Sin embargo, en muchos casos es difícil diferenciar dos especies usando sólo las secuencias del gen 16S ARNr, puesto que muchas especies presentan un alto grado de similitud, a veces mayor del 99%, aunque están claramente separadas por los valores de hibridación (Rosselló-Móra y Amann, 2001). Por este motivo, Stackebrandt y Ebers (2006) propusieron elevar este valor al 98,7-99,0% de similitud de secuencia como nuevo punto de corte. En un trabajo más reciente, Meier-Kolthoff y colaboradores (2014), han propuesto un rango similar como punto de corte del 98,2-99,0%. Recientemente, Kim y colaboradores (2014) han propuesto un nuevo punto de corte del 98,65% como valor de similitud de secuencia del gen 16S ARNr para reconocer nuevas especies, basándose en un amplio estudio entre valores de ANI y de similitud del gen 16S ARNr.

1.4.2.4. Análisis filogenético.

La filogenia basada en el análisis de los genes 16S y 23S ARNr ha llevado a la construcción de árboles filogenéticos que ilustran la relación evolutiva entre diferentes organismos, dando como resultando la división de todas las formas de vida en tres dominios principales: Arquea, Bacteria y Eucaria (Fox *et al.*, 1980; Woese *et al.*, 1985; Fox y Stackebrandt, 1987; Woese, 1987; Woese *et al.*, 1990; Embley y Stackebrandt, 1994; Stackebrandt y Goebel, 1994; Stackebrandt y Ebers, 2006). Las cepas que muestran valores por encima del punto de corte del 70% de hibridación ADN-ADN se considera que pertenecen a la misma especie (Wayne *et al.*, 1987) y este punto de corte es equivalente a un valor de similitud del gen 16S ARNr (Stackebrandt y Goebel, 1994) del 97%. Este punto de corte puede usarse para determinar si dos cepas no pertenecen a la misma especie, pero no puede usarse como la única característica para definir una especie. En cualquier caso, para tener una identificación fiable son necesarios tanto el análisis filogenético como los análisis fisiológicos.

Actualmente la definición de un nuevo género o especie requiere la obtención de la secuencia del ADNr 16S completa, el alineamiento de dicha secuencia con secuencias de referencia obtenidas de bases de datos con especies válidamente descritas, como son EzTaxon (Kim *et al.*, 2012) o la de Ribosomal Database Project (Cole *et al.*, 2009) y la determinación de las relaciones filogenéticas (Tindall *et al.*, 2010).

En este sentido, es muy importante saber que el orden de ramificación en los árboles filogenéticos depende no solo de diferencias en la composición de las bases, el tiempo de evolución, distintas tasas de evolución en diferentes regiones de los genes ARNr, sino

también en el número de organismos y en la selección de las cepas de referencia usadas. Por tanto, lo mejor es incluir una amplia selección de organismos de referencia tanto aparentemente relacionados como no relacionados. También es necesario determinar el grado de significación de las ramificaciones en un árbol filogenético mediante el análisis de *bootstrap*. Adicionalmente a todas las variables consideradas anteriormente, hay que tener en cuenta que los árboles filogenéticos pueden ser sensibles a los algoritmos elegidos para construir el árbol, y que las cepas pueden recolocarse en el árbol en función del algoritmo empleado, según se base en matrices de distancias (Jukes y Cantor, 1969; Kimura, 1980; Tajima y Nei, 1984) o en datos de caracteres discretos, como Máxima parsimonia (Edwards y Cavalli-Sforza, 1965) o Máxima verosimilitud (Felsenstein, 1973 y 1981).

1.4.2.5. Análisis multigénico (MLSA).

Con el fin de compensar el bajo poder de resolución que presenta el gen 16S ARNr para distinguir cepas de la misma especie o incluso entre especies del mismo género, se ha examinado de forma complementaria, el potencial de otras secuencias génicas conservadas que codifican proteínas como relojes microbiológicos y su utilidad en estudios filogenéticos. Se ha visto que los denominados genes *housekeeping* también pueden ser utilizados para establecer las relaciones filogenéticas de los microorganismos. Algunos de los genes más utilizados son la subunidad beta de la ADN girasa (*gyrB*), el factor $\sigma 70$ de la ARN polimerasa (*rpoD*), la subunidad beta de la ATP sintetasa (*atpD*), proteínas de recombinación (*recA* y *recN*), los factores de elongación EF-G (*fusA*), etc. (Ludwig *et al.*, 1998; Ludwig y Schleifer, 1999; Zeigler, 2003). Estos genes alternativos deben cumplir también que estén universalmente distribuidos entre las bacterias, que sus genes no se transmitan horizontalmente y que su tasa de evolución molecular sea comparable o algo superior a la del 16S ADNr. La tasa de evolución de estos genes en el genoma está relacionada con la función celular que presentan sus productos génicos, de manera que según el nivel de resolución al que se quiere llegar se debe utilizar un gen u otro.

En la actualidad se están imponiendo los estudios multigénicos o MLSA que consisten en el análisis de secuencia de dos o más genes concatenados. Este análisis se está proponiendo como la herramienta alternativa que permite delimitar una especie procariota desde un punto de vista genómico y filogenético dado que tiene un alto poder de resolución para distinguir entre cepas estrechamente relacionadas. Las ventajas con respecto al análisis de un único gen son: (i) al incluir varios genes, la cantidad de nucleótidos analizados es mayor y en principio el poder de resolución aumenta; (ii) se pueden seleccionar genes con una determinada tasa de evolución en base al poder de resolución al que se quiere llegar; (iii) en caso de que algún gen seleccionado haya sufrido transferencia génica horizontal, el efecto de éste en el cladograma resultante puede quedar amortiguado por el resto de genes concatenados, mostrándose por tanto las relaciones filogenéticas de los microorganismos (Pascual, 2010). No obstante, para poder validar esta aproximación es necesario realizar estudios de correlación entre la similitud de las secuencias génicas concatenadas y los valores de similitud genómica obtenidos mediante hibridación DNA-DNA o genomas secuenciados.

Otras ventajas que tiene el MLSA respecto a otras técnicas como la hibridación DNA-DNA, es su bajo coste, reproducibilidad intra- e interlaboratorio, la capacidad de establecer las relaciones filogenéticas de una manera más precisa y el poder almacenar la información en bases de datos. La tecnología de la secuenciación es rápida y reproducible. No obstante, el principal problema que existe hasta la fecha a la hora de aplicar el MLSA en la definición de especie procariota es encontrar la combinación de genes que se pueda aplicar en todos los grupos taxonómicos, pues los genes que correlacionan bien la información genómica en unos grupos taxonómicos pueden no hacerlo en otros. Por ello, los genes que deben ser utilizados en los estudios de MLSA nunca serán los mismos para todos los taxones. Son muchos los estudios que se han realizado en grupos taxonómicos concretos, pero escasos aquellos que han incluido una gran diversidad de grupos taxonómicos diferentes (Whitaker *et al.*, 2003; Rademaker *et al.*, 2007; Lang *et al.*, 2013). En el caso de actinomicetos, los trabajos de Huang y colaboradores, han demostrado que el análisis filogenético basado en MLSA, utilizando 6 genes *housekeeping* (atpD, gyrB, recA, rpoB, trpB y 16S rRNA) es más preciso y consistente para delimitar las especies dentro del género *Streptomyces* (Guo *et al.*, 2008; Rong, X. y Huang, Y., 2010 y 2012; Rong *et al.*, 2010).

1.4.2.6. Secuenciación de genomas.

En la actualidad, están disponibles más de 6000 genomas de procariotas en bases de datos públicas (National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>), European Molecular Biology Laboratory (<http://www.ebi.ac.uk/genomes/>) and Genomes Online Database (<http://www.genomesonline.org>)) (Ramasamy *et al.*, 2014).

Los avances tecnológicos de secuenciación han dado lugar a una nueva generación denominada *Next-Generation Sequencing* (NGS) que ha aportado una aproximación rápida y con una relación coste/beneficio elevada para obtener secuencias de todo el genoma de cepas de microorganismos. Las plataformas de NGS se basan en distintas tecnologías como pirosecuenciación (sistema de secuenciación de Roche 454) o la secuenciación por síntesis basada en amplificación cruzada y terminadores reversibles (Illumina) (Bentley, 2006). En la actualidad, existe una tercera generación de tecnologías de secuenciación como son la de Pacific Biosciences, que permite la secuenciación de una única molécula en la que no se precisa una amplificación previa o la tecnología de Ion Torrents (Life Technologies). En general, la precisión de secuenciación de las plataformas NGS es superior al 99% aunque para ello se precisan al menos 30 lecturas de cada región para poder ensamblar los contigs individuales (Chun y Rainey, 2014)

La secuenciación de genomas, permite además tener información precisa del contenido en G+C del microorganismo. A partir de la información generada por la secuencia completa del genoma, se han desarrollado diversos parámetros que permitan discriminar entre especies. Entre otros, están el máximo índice de coincidencia única (MUMi) que es un índice de distancia genómica basado en la parte conservada del ADN y la proporción del ADN que comparten dos genomas (Deloger *et al.*, 2009), la regresión tetranucleotídica, que cuantifica

las diferencias entre los valores de frecuencia observados y esperados de todas las 256 combinaciones de tetranucleótidos posibles (Richter y Rosselló-Móra, 2009), la comparación completa entre genomas mediante la identificación por BLAST de todos los emparejamientos con mayor índice (Auch *et al.*, 2010), la distancia filogenética del genoma BLAST (GBDP) (Henz *et al.*, 2005). Algunos de estos parámetros, como hemos comentado anteriormente, se han postulado como sustitutos del análisis de DDH.

1.5. Estimación de la diversidad de las cepas aisladas: índices de diversidad.

Como ya hemos comentado con anterioridad, los criterios taxonómicos más ampliamente aceptados para delimitar el nivel al cual podemos definir una especie bacteriana son el valor de más del 70% de homología en la reasociación ADN-ADN y el valor de más del 97% de homología en la secuencia del gen ribosomal 16S. Sin embargo, ya que los métodos de reasociación ADN-ADN son complejos y muy laboriosos, el número de cepas a las que se puede aplicar en la práctica es muy limitado, lo cual condiciona enormemente los estudios sobre la diversidad de una población microbiana, en donde debe analizarse un gran número de cepas. Debido a ello, se han desarrollado numerosas técnicas basadas en patrones de amplificación mediante PCR que, si bien no reemplazan los métodos de reasociación ADN-ADN, sí que pueden proporcionar información equivalente y resultados comparables a los de esta técnica. Algunas de las técnicas que han demostrado ser altamente discriminatorias para determinar la diversidad taxonómica y las relaciones filogenéticas de las poblaciones bacterianas son los métodos de rep-PCR, aunque estas técnicas discriminan a distinto nivel taxonómico y proporcionan distinta información dependiendo del grupo taxonómico que se trate. Por esta razón, y con el fin de asegurar que cualquier método que se emplee para caracterizar una población bacteriana es suficientemente eficaz, éste debe cumplir las siguientes características: 1) que permita caracterizar el mayor número posible de cepas dentro de una población, 2) que sea reproducible y consistente y 3) que tenga un alto poder de discriminación. Las dos primeras características son relativamente fáciles de cuantificar y a menudo se expresan simplemente como porcentajes. La tercera característica, el poder de discriminación, es la capacidad de un método de caracterización para distinguir entre cepas no relacionadas y viene determinado por el número de diferentes tipos definidos por el método empleado y las frecuencias relativas de dichos tipos.

Una forma sencilla de medir o estimar la diversidad de un conjunto de cepas como resultado de la aplicación de un método de caracterización determinado es calculando en primer lugar la riqueza (**S**) que es el número total de OTUs en una muestra y luego ver si existen diferencias significativas en el número de cepas presentes en cada categoría, cluster u OTU. De esta forma, podemos calcular la cantidad media esperada para cada categoría (N_e) estimada como el número total de cepas dividido por el número de categorías, $N_e = N/n$ siendo N el número total de cepas y n el número de categorías.

En general, para estudiar la diversidad de cepas presente en una población, hay que tener en cuenta que en la mayoría de las poblaciones muestreadas, unas pocas especies (OTUs) son abundantes, mientras que la mayoría son raras y están representadas por una o

dos cepas, generando una larga cola en las gráficas en las que se representan las especies (OTUs) ordenadas por su abundancia (Hughes *et al.*, 2001)

Con el fin de poder estimar y comparar la riqueza de especies presentes en una población, así como la comparación entre los métodos de caracterización de cepas, se han desarrollado numerosas aproximaciones estadísticas como las curvas de rarefacción o los estimadores de la riqueza. Entre estos últimos tenemos la extrapolación a partir de curvas de acumulación de especies, los estimadores paramétricos y los estimadores no-paramétricos. Estos últimos están siendo muy empleados en estudios de diversidad microbiana y se basan en la proporción de especies que se han observado con anterioridad en una población frente a aquéllas que sólo se han observado una sola vez, ya que en una comunidad muy diversa, la probabilidad de que una especie se observe más de una vez es muy baja, dado que la mayoría de las especies estarán representadas por un único individuo dentro de la muestra (Tom *et al.*, 2003).

Cualquiera que sea el método que se emplee para definir una OTU, se requieren medidas apropiadas para describir y comparar las comunidades microbianas con elevada diversidad (Hill *et al.*, 2003). Hunter y Gaston (1988) propusieron emplear un único índice numérico de discriminación (D) basado en la probabilidad de que dos cepas no relacionadas tomadas de la población estudiada se situaran en diferentes grupos de los tipos definidos. Esta probabilidad puede calcularse mediante el índice de diversidad de Simpson, desarrollado para la descripción de la diversidad de especies dentro de un hábitat ecológico (Simpson, 1949). Así pues, este índice puede aplicarse para comparar directamente el poder de discriminación de diferentes métodos de caracterización. Además, es muy recomendable que cuando se desarrolla un método de caracterización o cuando se aplica por primera vez a otros grupos taxonómicos, debe tratarse de que el poder de discriminación sea lo más alto posible. El nivel de discriminación que se puede considerar aceptable dependerá de diversos factores, pero en cualquier caso es deseable que este índice sea mayor de 0,90 si queremos que los resultados de la caracterización se puedan interpretar con confianza. El índice de discriminación empleado por Hunter y Gaston se ha usado ampliamente para comparar el poder de discriminación de los métodos de caracterización y la determinación del mismo se recomienda actualmente para la evaluación de los métodos de caracterización (Burucoa *et al.*, 1999).

Además del índice de diversidad de Simpson, existen otros muchos índices de diversidad descritos en la bibliografía. Los índices de diversidad están formados por dos componentes: el número o riqueza de especies, y el equilibrio o uniformidad en la distribución de las cepas entre las distintas categorías, es decir, la abundancia de cada especie (Ludwig y Reynolds, 1988; Krebs, 1989).

Otro de los índices más ampliamente utilizado es el índice de diversidad de Shannon (H') o de Shannon-Weiner que tiene en cuenta dos aspectos de la diversidad, la riqueza de las especies y la uniformidad de la distribución del número de individuos de cada especie. Este índice H' tiene un valor de 0 si solo hay una especie, y alcanza su valor máximo si todas

la especies del conjunto están representadas por un número igual de individuos (Zak y Willig, 2004). En la mayoría de los ecosistemas naturales H' varía entre 1 y 5.

El índice de Shannon da un peso moderado a las especies raras e intermedias en comparación con las especies dominantes, haciendo este índice más sensible a cambios en la abundancia de especies raras que otros índices de diversidad. Conviene recordar que H' es una medida y no la probabilidad de predecir la identidad de la siguiente cepa bacteriana. Además, el valor de H' depende del grado de resolución utilizado para definir una OTU, obteniéndose generalmente los valores más altos cuando se emplea la secuenciación.

H' está en una situación intermedia entre S (riqueza) y D (índice de Simpson) en cuanto al peso dado a las OTUs raras o abundantes. S da mucho peso a las OTUs raras mientras que D da mucho peso a las OTUs abundantes. Sin embargo, H' da un peso más moderado y amplio a OTUs raras y con abundancia intermedia con respecto a las dominantes. De esta forma H' es un índice que es más sensible a los cambios en la abundancia de los grupos raros.

1.6. Técnicas moleculares y fenotípicas aplicadas al estudio de la diversidad de las cepas aisladas.

1.6.1. Caracterización basada en perfiles de amplificación por PCR: *ADN fingerprinting.*

El *fingerprinting* o caracterización de cepas en base a la obtención de diversos perfiles de amplificación y/o restricción puede llevarse a cabo mediante diferentes herramientas con alto poder discriminatorio y que puedan ser capaces de diferenciar claramente entre cepas no relacionadas y al mismo tiempo estimar la relación entre los organismos. El poder discriminatorio se expresa cuantitativamente con el índice de diversidad de Simpson (Simpson, 1949; Hunter y Gaston, 1988). Este índice es una medida de la probabilidad de que un método asigne un tipo diferente a dos cepas no relacionadas muestreadas al azar y debe generar un valor mayor de 0,95 (Blanc *et al.*, 1998). En este sentido los métodos moleculares pueden diferir ampliamente en su capacidad para diferenciar cepas. Otro de los requisitos que deben cumplir estos métodos de caracterización de cepas es la reproducibilidad, que permite la construcción de bases de datos de referencia (Olive y Bean, 1999). Un tercer requisito que deben tener los métodos de *fingerprinting* es la capacidad de caracterización o de tipado que mide el número de microorganismos que pueden caracterizarse con un método determinado y se expresa cuantitativamente mediante el porcentaje de cepas caracterizables. Un buen método de caracterización genómica debe ser capaz de caracterizar todas las cepas estudiadas (Buruco *et al.*, 1999).

Muchas de las técnicas moleculares de caracterización se basan en la separación electroforética de fragmentos de ADN de diferente longitud, dando como resultado un patrón de bandas en un gel. Aunque un método de caracterización determinado pueda tener un alto

poder de discriminación y una buena reproducibilidad, la complejidad del proceso y la interpretación de los resultados así como el coste que conlleva el implementar y luego realizar el análisis puede estar alejado de las posibilidades reales de un laboratorio. Por tanto, la elección de un método de caracterización molecular depende de las necesidades, del nivel de capacidad técnica y de los recursos del laboratorio. Métodos tales como la PCR específica de *locus*, el análisis de RAPD y la rep-PCR son parecidos en sus procedimientos y son generalmente los más fáciles de implementar. Otro criterio que hay que considerar es la capacidad de un método para permitir el análisis de un gran número de muestras. Si se requiere un alto procesamiento de muestras, lo más adecuado es utilizar técnicas sencillas con un alto poder de discriminación y un bajo coste tales como la rep-PCR.

Los métodos de caracterización del ADN basados en la PCR (Mullis y Faloona, 1987) son de gran interés porque son universalmente aplicables, son sencillos y rápidos. Diferentes aplicaciones de esta técnica permiten la observación de polimorfismos genéticos entre organismos y dependiendo de las condiciones de cada experimento se puede obtener la amplificación específica o inespecífica de fragmentos de ADN (Giovannoni, 1991; Anzai *et al.*, 1994; Hirsch y Sigmund, 1995; Novella *et al.*, 1996). Dentro de la metodología de la PCR se han diseñado varias técnicas que bien hacen uso de cebadores específicos de secuencia o bien cebadores con secuencias arbitrarias. Entre estas últimas técnicas cabe destacar la (*Arbitrary Primed PCR*) (Welsh y McClelland, 1990) y RAPD (Williams *et al.*, 1990). Alternativamente, pueden usarse cebadores que son secuencias consenso complementarias a fragmentos de elementos repetitivos dispersos a lo largo de todo el genoma tanto de bacterias gram-positivas como de gram-negativas (Versalovic *et al.*, 1991; Lupski y Weinstock, 1992) o bien de fragmentos de genes codificantes de los ARNt (Welsh y McClelland, 1991; Welsh y McClelland, 1992). Este último método de PCR permite diferenciar tanto a nivel de especie como de intraespecie según lo restrictivas que sean las condiciones de la PCR. También se han descrito métodos que permiten amplificar los genes ADN_r empleando cebadores universales para estos genes, basándose esta técnica en el hecho de que los polimorfismos existentes entre los diversos operones de los ARN_r generan una colección de fragmentos de ADN con diferentes longitudes (Jensen *et al.*, 1993).

Tabla 3: Métodos de caracterización genotípica según su capacidad para distinguir géneros/especies o subespecies/cepas (Versalovic *et al.*, 1998a)

<u>GÉNEROS/ESPECIES</u>	<u>SUBESPECIES/CEPAS</u>
Ribotipado	ARDRA
ARNt-PCR	RFLP del cromosoma
IGS-PCR	Secuenciación de la región IGS
Secuenciación del gen 16S ARN _r	RFLP de los plásmidos
	PFGE
	RAPD
	Rep-PCR

1.6.1.1. Polimorfismos de longitud de las regiones espaciadoras de los genes 16S-23S: IGS-PCR.

En procariotas, las regiones espaciadoras que separan los *loci* de los ARNr 16S, 23S y 5S tienen un alto grado de variación tanto en su secuencia como en su longitud entre los distintos géneros y especies. Dentro de un mismo genoma hay con frecuencia múltiples operones de ARNr (de 1 a 14 copias) y a su vez, las regiones espaciadoras dentro de estos *loci* también presentan un significativo grado de variación en longitud y en secuencia. Gracias a esto, Jensen y colaboradores (1993) diseñaron una pareja de cebadores (G1/L1) y condiciones de PCR para amplificar las regiones espaciadoras de los genes 16S y 23S en los *loci* de ARNr de procariotas, dando lugar al análisis de IGS-PCR. Las regiones IGS entre los genes 16S y 23S ARNr pueden incluir varios genes ARNt y regiones no codificantes que al estar bajo una menor presión selectiva y por tanto son más variables que los propios genes 16S y 23S ARNr. Al utilizar la pareja de cebadores universales G1/L1, la caracterización de bacterias basada en el IGS se debe al número y longitud de los productos de amplificación de la PCR. La presencia de más de una banda en una única cepa bacteriana es el resultado de la amplificación de las distintas regiones de longitud variable dentro de cada operón ribosomal. De hecho, la variabilidad entre operones dentro de un genoma con múltiples operones de ADNr puede ser tan grande como la variabilidad entre cepas estrechamente relacionadas (Louws *et al.*, 1999). Esta técnica se ha utilizado ampliamente con éxito para distinguir entre cepas de una misma especie en numerosos grupos bacterianos, incluidos los actinomicetos (Hirsch y Sigmund, 1995; Nagpal *et al.*, 1998; Roth *et al.*, 1998; Boyer *et al.*, 2001). La región espaciadora IGS también se ha utilizado para diseñar sondas específicas para la detección de determinados grupos de eubacterias (Barry *et al.*, 1991)

1.6.1.2. Amplificación de los espacios intergénicos de los genes para tRNA (tADN-PCR).

Esta técnica fue descrita por Welsh y McClelland (Welsh y McClelland, 1991; Welsh y McClelland, 1992) como otro método de *fingerprinting* basado en PCR para la detección de polimorfismos genéticos. La metodología de ADNt-PCR se basa en la conservación de los genes del ARN de transferencia (ARNt), los cuales frecuentemente se localizan en la región IGS entre los genes 16S y 23S ARNr, o en el extremo distal del gen 5S ARNr de las bacterias y en el análisis por PCR de los polimorfismos de longitud de los espaciadores intergénicos que se sitúan entre los genes ARNt (Maes *et al.*, 1997). La pareja de cebadores T5/AT3B son complementarias a las secuencias de los ARNt y permiten la amplificación de la región existente entre dos genes ARNt adyacentes, generando así unos perfiles de productos de amplificación de diferente tamaño que son específicos de género o de especie (Louws *et al.*, 1999).

La técnica de ADNt-PCR se ha aplicado para la diferenciación de especies de estreptococos, especies de *Acinetobacter*, estafilococos y especies de *Listeria* (Wiedmann-al-

ahmad *et al.*, 1994; Ehrenstein *et al.*, 1996; Maes *et al.*, 1997; Baele, *et al.*, 2000) o de actinomicetos (Hirsch y Sigmund, 1995).

1.6.1.3. Amplificación de secuencias genómicas repetidas (rep-PCR).

Entre los métodos basados en la generación de perfiles de amplificación mediante PCR, el denominado rep-PCR ha demostrado ser extremadamente reproducible, rápido y altamente discriminatorio (Versalovic *et al.*, 1991; Woods *et al.*, 1993; Versalovic *et al.*, 1994; Louws *et al.*, 1995; Versalovic *et al.*, 1998; Versalovic y Lupski, 1998). El fundamento de la técnica de rep-PCR se basa en que existen varias familias de secuencias repetitivas repartidas a lo largo de todo el genoma en diversas especies de bacterias que separan secuencias de copia única más largas (Lupski y Weinstock, 1992). La función de tales secuencias no es bien conocida aunque se ha postulado que pueden ser importantes en la organización cromosómica, la expresión génica, la estabilidad del ARNm o en interacciones ADN-proteína. Estas secuencias son muy útiles para caracterizar la estructura del genoma mediante un *fingerprinting* genómico (Louws *et al.*, 1995). Estos elementos son no-codificantes y están presentes en un alto número de copias en relación con los elementos repetidos de mayor tamaño que contienen secuencias codificantes. Tales elementos se han detectado tanto en bacterias Gram-negativas como en Gram-positivas, incluyendo varios géneros diferentes.

Se ha visto que estas secuencias repetitivas pueden usarse como sitios de unión de cebadores oligonucleotídicos para producir perfiles de amplificación del genoma específicos mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Esta técnica, denominada en general rep-PCR (Woods *et al.*, 1993), se basa en la observación de que estos cebadores, complementarios a dichas secuencias repetitivas y orientados de forma enfrentada, permiten la amplificación de fragmentos de ADN de diferente tamaño que contienen las secuencias existentes entre estos elementos repetitivos. Estos múltiples amplicones de diferente tamaño son separados mediante electroforesis y permiten así establecer perfiles de ADN específicos de cepas bacterianas individuales. Varios de estos elementos repetitivos están conservados en diversos géneros de bacterias y como consecuencia, permiten que una sola pareja de cebadores se pueda usar para obtener perfiles de amplificación de muchos microorganismos diferentes permitiendo la discriminación entre diversas cepas y especies de bacterias (Versalovic *et al.*, 1994).

Dado que la mayoría de los elementos repetitivos usados para el análisis de rep-PCR son secuencias palindrómicas, los cebadores deben corresponder a alguna de las mitades del palíndromo de tal forma que la estructura secundaria interna no imposibilite una amplificación efectiva. Los cebadores deben estar orientados hacia el exterior del elemento repetitivo y amplificar el ADN que existe entre elementos repetitivos consecutivos. Si los elementos son unidades perfectamente palindrómicas, entonces una única pareja de cebadores orientada hacia el exterior del centro del palíndromo puede generar los perfiles de amplificación. Si las repeticiones se distribuyen en el genoma en orientación invertida, entonces un único cebador puede ser suficiente para producir los patrones de amplificación. (Versalovic *et al.*, 1994).

Algunas de las ventajas clave de la rep-PCR son su rapidez y reproducibilidad. En cuanto a su sensibilidad, se ha visto que la rep-PCR es más útil cuando se quiere distinguir entre cepas o subespecies (Versalovic *et al.*, 1998). Además, es importante resaltar que los resultados del análisis de *clusters* generados por rep-PCR son coincidentes con datos generados por otras aproximaciones, incluyendo el biotipado, el análisis de RFLP, la hibridación ADN-ADN (Rademaker *et al.*, 2000), la electroforesis de enzimas *multilocus* (MLEE), el tipado de fagos, el perfil de plásmidos, la electroforesis de campo pulsado (PFGE) o el ribotipado, siendo claramente la rep-PCR el método más útil para diferenciar bacterias estrechamente relacionadas permitiendo distinguir las bacterias a nivel de especie, subespecie y cepa (Nick *et al.*, 1999). Otra ventaja adicional del método es que genera perfiles de amplificación de todo el genoma, contrariamente al análisis del gen 16S ARNr que está basado en las características de un solo gen. Además, la experiencia ha demostrado que la técnica de rep-PCR, especialmente con los cebadores de ERIC y BOX, es bastante robusta y no está sujeta a tanta variabilidad como la encontrada con otros protocolos de amplificación mediante PCR, tales como la técnica de RAPD (Louws *et al.*, 1995).

Como ya se ha comentado en varias ocasiones, el cálculo de los valores de homología ADN-ADN sigue siendo un elemento fundamental en los estudios taxonómicos, pero las aproximaciones basadas en homología de ADN-ADN son claramente inviables cuando se analizan grandes colecciones de cepas medioambientales, debido a las limitaciones experimentales de analizar grandes números de cepas mediante métodos de reasociación de ADN-ADN dos a dos. Sin embargo, dada la correlación que se ha observado entre los datos de homología de ADN-ADN y la rep-PCR, junto con el gran poder de resolución de la rep-PCR, especialmente a nivel de especie, subespecie o cepa, ha llevado a que diversos autores hayan propuesto que esta aproximación sea una alternativa o al menos, un cribado previo para seleccionar aquellas cepas que deban someterse a posteriores estudios de homología de ADN-ADN (Rademaker *et al.*, 2000).

a.- REP-PCR.

Gilson y colaboradores (Gilson *et al.*, 1984; Gilson *et al.*, 1986; Gilson *et al.*, 1987) describieron una familia de secuencias de unos 20 a 40 nucleótidos que están dispersas en el ADN bacteriano y que son altamente repetitivas, palindrómicas y extragénicas, es decir, están siempre situadas en regiones no codificantes del ADN bacteriano. Stern y colaboradores (Stern *et al.*, 1984) las definieron como secuencias REP (*Repetitive Extragenic Palindromic*-secuencia repetitiva extragénica palindrómica) y observaron que son secuencias altamente conservadas, presentes en varias copias (más de 500), las cuales en total pueden ocupar entre un 0,5% y un 1% de todo el genoma de *E. coli* y *S. typhimurium*.

Versalovic y colaboradores (1991) diseñaron unos cebadores complementarios a dichas secuencias REP y establecieron unas condiciones de amplificación por PCR para caracterizar las cepas bacterianas mediante ADN *fingerprinting* dando lugar a la técnica de REP-PCR.

b.- ERIC-PCR.

Sharples y Lloyd (1990) y posteriormente Hulton y colaboradores (1991) describieron otras secuencias repetitivas altamente conservadas y localizadas dentro de las regiones intergénicas de los cromosomas de *E. coli*, *S. typhimurium* y otras enterobacterias. Las denominadas secuencias ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequence*-secuencia repetitiva consenso intergénica de enterobacterias) tienen entre 124 y 127 pares de bases y aunque están altamente conservadas, su localización en el cromosoma difiere según las especies.

La pareja de cebadores ERIC ha demostrado su utilidad para estudiar la diversidad de numerosos grupos taxonómicos, incluso aunque no estén dirigidos necesariamente a elementos ERIC (Gillings y Holley, 1997). Estos cebadores son más sensibles a condiciones de amplificación subóptimas, tales como la presencia de contaminantes en las preparaciones de ADN pero también genera perfiles altamente discriminatorios (Rademaker y De Bruijn, 1997).

c.- BOX-PCR.

El método de BOX-PCR se basa la utilización de un cebador que es complementario a secuencias repetitivas repartidas a lo largo del genoma que permite la amplificación de fragmentos de ADN de diferente tamaño provenientes de las secuencias existentes entre estos elementos. Estas secuencias repetitivas fueron localizadas por primera vez en el cromosoma de *Streptococcus pneumoniae* por Martin y colaboradores (Martin *et al.*, 1992) siendo, por tanto, el primer elemento repetitivo altamente conservado localizado en un Gram-positivo. Originalmente se identificaron tres subunidades diferentes dentro de los elementos BOX, denominadas boxA (57pb), boxB (43pb) y boxC (50pb) (Koeuth *et al.*, 1995), aunque posteriormente se ha demostrado que sólo las secuencias del tipo de la subunidad boxA están altamente conservadas entre diversas bacterias, tanto Gram-positivas como Gram-negativas (Versalovic *et al.*, 1994). Dado que las secuencias del tipo boxA están ampliamente conservadas en el reino bacteria, se ha visto que es muy útil emplear el cebador BOXA1R para obtener perfiles de amplificación en muchos microorganismos.

En cualquier caso, si el fin es diferenciar entre cepas o identificar rápidamente una cepa desconocida por comparación con un control conocido, se ha visto que BOX-PCR es una de las técnicas más útiles de ADN *fingerprinting*, ya que genera unos perfiles de amplificación sólidos, reproducibles y suficientemente complejos para poder distinguir entre organismos no emparentados entre sí. (Rademaker y De Bruijn, 1997), siendo además la técnica menos sensible a la presencia de contaminantes en el ADN y por tanto generando perfiles de amplificación incluso bajo condiciones subóptimas (Louws *et al.*, 1995).

En el caso de los actinomicetos, numerosos autores han utilizado la técnica de BOX-PCR para distinguir entre cepas, por ejemplo, de *Streptomyces* (Sadowsky *et al.*, 1996; Davelos *et al.*, 2004a). Otro estudio llevado a cabo con especies de *Streptomyces* fue el realizado por Lanoot y colaboradores (2004) cuyo objetivo era evaluar cuál era el mejor

método de *fingerprinting* para poder diferenciar diversas especies de *Streptomyces*. Para ello utilizaron varios cebadores usando diferentes protocolos de PCR, como son BOXA1R (BOX-PCR), (GTG)₅ (46), ERIC1R y ERIC2 (ERIC-PCR) y la pareja REP1R-I y REP2-I (REP-PCR). Además, compararon estos resultados con los generados por hibridación de ADN-ADN. Usando el método de BOX-PCR se obtuvieron unos patrones de bandas más robustos y reproducibles y con una alta correlación entre los perfiles de amplificación y los datos de homología ADN-ADN.

d.- (GTG)₅.

Un último ejemplo de secuencias altamente repetitivas en los genomas de los procariotas son las secuencias de politrinucleótidos. Por ejemplo, los politrinucleótidos (GTG)₅ o (GCC)₅ son muy frecuentes en los genomas de *E. coli* y de *Salmonella typhimurium* (Doll *et al.*, 1993). Tales elementos se han detectado tanto en bacterias Gram-negativas como en Gram-positivas, incluyendo varios géneros diferentes.

El politrinucleótido (GTG)₅ se ha aplicado para distinguir diversos grupos taxonómicos como bacterias ácido lácticas (Gevers *et al.*, 2001), cepas del género *Thioalkalivibrio* (Foti *et al.*, 2006), *Bifidobacterium* (Masco *et al.*, 2003) o rizobios (Nick *et al.*, 1999), aunque su uso en general es menos frecuente que otras técnicas de rep-PCR.

1.6.2. Caracterización basada en la detección de secuencias específicas de rutas biosintéticas: sistemas PKS-I, PKS-II, NRPS, APH y HMG CoA reductasa.

Los métodos de desreplicación basados en criterios morfológicos, quimio-taxonómicos y moleculares, han demostrado ser de incalculable valor. Sin embargo, también presentan sus limitaciones al no poder predecir el potencial metabólico de los microorganismos. Por este motivo, el desarrollo y aplicación de herramientas alternativas que permitan conocer, en cierta medida, su potencial y asegurar la inclusión de organismos productores en los programas de *screening* es de gran interés.

Parece claro que algunos grupos taxonómicos concretos son prolíficos productores de productos naturales. Los genomas de muchos *Streptomyces* contienen más de 20 *clusters* de genes de productos naturales pero la mayoría de los genomas de procariotas carece de ningún *cluster* de genes de productos naturales (Bentley *et al.*, 2002). Los poliquétidos son excelentes ejemplos de metabolitos secundarios bioactivos. Las sintasas modulares de poliquétidos (PKS-I) (Hopwood, 1997), las sintasas iterativas de poliquétidos (PKS-II) (Hopwood, 1997; Shen, 2003) y las sintetasas de péptidos no-ribosomales (NRPS) (Schwarzer *et al.*, 2003) son responsables de la síntesis en los actinomicetos de un amplio rango de metabolitos secundarios estructuralmente diversos. Una aproximación alternativa a los métodos descritos anteriormente es la caracterización de las cepas basada en su potencial metabólico, detectando genes implicados en la producción de compuestos bioactivos principalmente de rutas biosintéticas PKS-I, PKS-II y NRPS (Metsä-Ketelä *et al.*, 2002; Ayuso, 2003; Ayuso-Sacido y Genilloud, 2005). En menor medida, los actinomicetos

son también productores de aminoglicósidos y compuestos isoprenoides con diferentes actividades biológicas (Walsh, 2003).

La organización genética de los genes que codifican los complejos biosintéticos tipo PKS-I consiste en uno o varios ORFs agrupados dentro del mismo *cluster*, cada uno de los cuales codifica para un polipéptido que contiene uno o varios módulos. Estos módulos contienen dominios funcionales semiautónomos con actividades para reconocer, activar, incorporar y modificar diferentes sustratos en la cadena poliquetídica naciente. Se han descrito seis dominios funcionales en actinomicetos: cetosintasa (KS), que lleva a cabo una condensación descarboxilativa de dos unidades de extensión; aciltransferasa (AT), que lleva a cabo el reconocimiento específico del sustrato y su unión al grupo prostético 4'-fosfopanteteína unido a la proteína portadora de grupos acilos (ACP) y dehidratasa (DH), enoilreductasa (ER) y ceto-reductasa (KR), que llevan a cabo diferentes etapas de reducción del C^β. Los tres primeros son necesarios en cada ciclo de extensión de la cadena poliquetídica y constituyen la unidad funcional mínima. Cada módulo es responsable de un ciclo de incorporación y modificación del sustrato en el proceso de extensión de la cadena poliquetídica. Es un proceso no reiterativo, donde el número de módulos, generalmente, se corresponde con el número de sustratos incorporados (Khosla *et al.*, 1999)

Los genes que codifican los sistemas PKS-II aparecen en número y orientación variable dentro del mismo *cluster* biosintético y, a diferencia de los sistemas PKS-I, cada gen codifica un polipéptido monofuncional (ocasionalmente bifuncional). La unidad funcional mínima responsable de la síntesis de la cadena poliquetídica está constituida por tres polipéptidos: KS α , KS β y ACP. Estas tres subunidades controlan la incorporación de la subunidad inicial y el número de ciclos de extensión, hasta completar la síntesis de la cadena poliquetídica, en un proceso iterativo en el que las mismas unidades son utilizadas en cada ciclo de extensión.

Los genes que codifican los complejos biosintéticos NRPS responsables de la síntesis de péptidos no ribosomales, aparecen agrupados dentro del mismo *cluster*. Consisten en uno o varios ORFs, cada uno de los cuales codifica para una proteína multifuncional con uno o varios módulos, que a su vez presentan diferentes actividades responsables de la activación, incorporación y modificación del sustrato aminoacídico a la cadena peptídica, a través de un mecanismo de síntesis similar al utilizado por las PKS-I y FAS-I, dando lugar a estructuras lineales, cíclicas o ramificadas de entre 2 y 48 residuos que pueden, además, sufrir otras modificaciones posteriores (Mootz *et al.*, 2002; Schwarzer *et al.*, 2003). Tres actividades son necesarias para completar cada ciclo de elongación: condensación (C), adenilación (A) y tiolación (PCP) (Arnez *et al.*, 1997).

Con el objetivo de detectar estas rutas biosintéticas, se han diseñado y validado oligonucleótidos degenerados para PCR complementarios de secuencias de PKS-I, PKS-II y NRPS de actinomicetos, facilitando de este modo la rápida detección de estas rutas biosintéticas (Ayuso, 2003; Ayuso-Sacido y Genilloud, 2005). De igual manera, se han usado oligonucleótidos para PCR dirigidos a genes de la fosfotransferasa de aminoglicósidos (APH) para detectar genes de resistencia asociados a estas rutas de biosíntesis (Huddleston *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 2002). También se ha estudiado la presencia de rutas de biosíntesis de

compuestos isoprenoides en actinomicetos mediante oligonucleótidos para PCR diseñados para detectar la presencia de la reductasa 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG CoA) (Sigmund *et al.*, 2003).

Así pues, la posibilidad de estudiar la presencia y distribución de sistemas NRPS, PKS-I y PKS-II en los diferentes grupos de actinomicetos, así como la presencia de tales sistemas en poblaciones de cepas salvajes de actinomicetos, permite seleccionar aquellas poblaciones con mayor potencial para sintetizar compuestos derivados de sistemas NRPS, PKS-I y PKS-II, aumentando de esta forma, la probabilidad de encontrar metabolitos secundarios bioactivos (Ayuso *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009b; Gontang *et al.*, 2010; Schneemann *et al.*, 2010).

1.6.3. Caracterización basada en perfiles de restricción: RFLP.

La primera generación de métodos de caracterización basados en el ADN fue el análisis de fragmentos de restricción del genoma completo (RFLPs) (Vanechoutte, 1996) y el análisis de plásmidos. El número de fragmentos de ADN puede reducirse seleccionando enzimas de restricción que reconozcan pocos sitios de corte del ADN y su resolución mediante electroforesis de campo pulsado. Esta técnica es a menudo considerada como el método más discriminatorio de caracterización del ADN.

Otro método es la técnica del ribotipado que consiste en transferir a una membrana los fragmentos de restricción del ADN total y su hibridación con una sonda marcada (Laurent *et al.*, 1996).

La caracterización del ADN basado en la PCR se ha combinado también con el uso de enzimas de restricción dando lugar al llamado análisis de ARDRA (Heyndrickx *et al.*, 1996). En este método, el producto de PCR es el gen 16S o el 23S ADNr o bien fragmentos de ambos genes con o sin la región espaciadora, amplificados mediante cebadores universales que se localizan en las regiones conservadas de los genes ARNr. Este amplicón se digiere posteriormente con una combinación seleccionada de enzimas de restricción. La técnica de ARDRA es útil para identificar las cepas a nivel de especie o por debajo de especie aunque en algunos casos el análisis de los patrones generados con varias enzimas de restricción suministra también información por encima de especie.

Otra técnica que combina la PCR y el uso de enzimas de restricción es la técnica de AFLP (Vos *et al.*, 1995) basada en la amplificación selectiva de fragmentos de restricción. Esta metodología ha demostrado su utilidad para diferenciar entre especies y subespecies así como una caracterización más fina de cepas individuales.

1.6.4. Caracterización química: perfiles de metabolitos secundarios mediante HPLC o HPLC-MS.

La singularidad en la taxonomía de los cultivos no garantiza la identificación de nuevos metabolitos secundarios producidos por los mismos. Es bien sabido que microorganismos que no están relacionados taxonómicamente pueden producir los mismos compuestos, de la misma forma que cepas muy próximas taxonómicamente pueden no compartir sus perfiles de metabolitos secundarios.

La separación cromatográfica de los metabolitos secundarios presentes en un extracto se obtiene mediante técnicas rápidas, reproducibles y con altos niveles de resolución. Entre las técnicas más aplicadas están la cromatografía en capa fina (TLC), la cromatografía de alta resolución (HPLC) o el HPLC acoplado a espectrometría de masas (HPLC-MS) (Dunn *et al.*, 2005; Dunn y Ellis, 2005). Los perfiles HPLC o HPLC-MS de los extractos, permiten establecer relaciones entre diferentes cepas. Al resolver una mezcla de metabolitos secundarios por medio de estas técnicas, los compuestos quedan definidos por diversos parámetros como el tiempo de retención, el área y la altura de los picos o por los valores de m/z detectados. En el caso del HPLC, la detección de los metabolitos puede realizarse mediante un detector UV-DAD (*Diode Array Detection*), que permite la medida de varias longitudes de onda de forma simultánea (Fiedler, 1984). El HPLC posee un poder de resolución muy elevado y es un importante método quimiotaxonómico que permite observar la diversidad de los metabolitos producidos. La aplicación de estas técnicas químicas para la caracterización de las cepas como una estrategia inicial de preselección de las mismas, es una herramienta muy adecuada que permite mejorar la calidad y la diversidad estructural de los extractos microbianos generados (Frisvad y Thrane, 1987; Julian *et al.*, 1998; Janso y Carter, 2010; Schneemann *et al.*, 2010).

1.6.5. Determinación de la actividad biológica antibacteriana y antifúngica.

Hoy en día, hay un renovado interés en el potencial biotecnológico de los metabolitos secundarios producidos por microorganismos, debido a que las colecciones de moléculas obtenidas por química combinatoria han fracasado o no han obtenido el resultado esperado en diversas áreas, no sólo en salud humana sino en otras áreas como salud animal, aplicaciones agrícolas y biotecnológicas.

El amplio espectro taxonómico y de diversidad genética y metabólica que muestran hongos y bacterias, los hacen especialmente interesantes para los programas de *screening* de productos naturales pero se requieren procedimientos que permitan evaluar la producción de compuestos con actividad biológica en estos organismos. Una forma de medir la capacidad de producción de metabolitos secundarios bioactivos con un potencial interés terapéutico es examinar las actividades antimicrobianas de los extractos de fermentación generados a partir de los microorganismos, bien mediante ensayos de difusión en agar frente a un conjunto de microorganismos diana, como bacterias patógenas y hongos de interés

clínico, entre los que se incluyen bacterias tanto Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) como Gram-negativas (*Escherichia coli*), y levaduras potencialmente patógenas (*Candida albicans*) (Suay *et al.*, 2000; Basilio *et al.*, 2003) o bien mediante técnicas de absorbancia o luminiscencia (Vesterlund *et al.*, 2004). En este contexto, se asume que existe una relación directa entre elevados números de actividades antimicrobianas y un metabolismo secundario prolífico (Davies, 1990 y 2014).

1.7. Herramientas de análisis de datos.

La comparación y la agrupación visual de múltiples perfiles, bien sean estos de caracteres fenotípicos como de complejos perfiles electroforéticos, es extremadamente difícil y por tanto, el análisis de los mismos depende del cálculo de algoritmos que precisan el uso de ordenadores y sistemas informáticos (Dijkshoorn *et al.*, 2001). El método estadístico de análisis de datos más comúnmente usado es el análisis de patrones o análisis de *clusters* que implica la comparación por pares de las cepas u objetos, seguido de su agrupamiento en base a la similitud y la consiguiente representación en una estructura tipo árbol denominada dendrograma. La idea de agrupar los organismos en base a su similitud global según un gran número de caracteres, aproximación denominada taxonomía numérica, fue desarrollada y aplicada a la microbiología por los estudios pioneros de Sneath y Sokal (1973). La clasificación automática de microorganismos en base a los perfiles electroforéticos de proteínas fue descrito por primera vez por Kersters y De Ley (1975). El programa informático originalmente desarrollado por el grupo de Kersters y De Ley evolucionó a lo largo de los años en los paquetes informáticos comerciales GelCompar y BioNumerics (Applied Maths NV, Sint Martens-Latem, Bélgica). Como ya se ha mencionado con anterioridad, el análisis de *clusters* puede aplicarse tanto a datos genotípicos como fenotípicos, incluyendo patrones electroforéticos de fragmentos de ADN, perfiles generados por espectrometría de masas o cromatografía de gases, o perfiles bioquímicos.

Cada día es mayor el número disponible de sistemas automáticos que generan datos fenotípicos complejos pero la comparación de los organismos en base a estos caracteres no puede realizarse sin el análisis de *clusters* o de componentes principales. Estos sistemas tienen un alto rendimiento y los datos generados, a veces, necesitan analizarse en combinación con otros conjuntos de datos, como por ejemplo, perfiles genómicos. En este sentido, el programa informático BioNumerics permite la combinación de todos los tipos posibles de caracteres a analizar.

1.7.1. Aspectos generales.

El propósito de la mayoría de los métodos de detección de patrones es representar la variación en un conjunto de datos de una forma más manejable mediante el reconocimiento de clases o grupos. Los datos, generalmente, están formados por un conjunto de objetos (cepas) descritos por un número de caracteres. Existen, principalmente, tres aproximaciones que permiten manejar conjuntos de datos grandes. El primero conlleva reducir el número de

caracteres encontrando dos o tres nuevos caracteres que son combinaciones de los caracteres originales. Al usar estos nuevos caracteres, los datos pueden de nuevo representarse en dos o tres dimensiones y los grupos se pueden distinguir mediante una inspección visual. Esta es la aproximación realizada por el análisis de componentes principales (PCA: *Principal Component Analysis*). La segunda aproximación para manejar grandes conjuntos de datos, no reduce el número de caracteres, pero implica una reducción paso a paso en el número de objetos al situarlos en grupos. Esta es la aproximación realizada con el análisis de *clusters* (van Ooyen, 2001). Una tercera aproximación que se ha utilizado en estudios de ecología microbiana es el análisis multivariante (Ramette, 2007).

Análisis de componentes principales (PCA).

El análisis de componentes principales es un procedimiento estadístico que estudia grandes conjuntos de datos por reducción del número de caracteres empleando una transformación lineal para convertir un conjunto de observaciones de posibles variables correlacionadas en un conjunto de valores de variables no correlacionadas denominadas componentes principales. El número de componentes principales es menor o igual que el número de variables originales. Esta transformación se define de tal forma que el primer componente principal tiene la mayor varianza posible, conteniendo por tanto, la mayor variabilidad de los datos, y cada componente principal sucesivo tiene a su vez la mayor varianza posible con la limitación de que es ortogonal, o lo que es lo mismo, que no está correlacionada con los componentes precedentes. Los componentes principales son ortogonales porque son los vectores de la matriz de covarianza, que es simétrica. De esta forma se asegura que se va a conservar tanta información como sea posible del conjunto de datos originales (Hope, 1968; Cooley y Lohnes, 1971). El análisis de componentes principales se emplea mayoritariamente en el análisis exploratorio de datos y para construir modelos predictivos.

En Bionumerics, el PCA puede realizarse directamente a partir de las curvas densitométricas, sin necesidad de aplicar ningún coeficiente de similitud, sino usando en su lugar la colección original de datos de los valores densitométricos. La base para calcular los tres ejes discriminantes principales en un espacio multidimensional es un conjunto de vectores de Eigen obtenidos a partir de la curvas. Con este método se pueden representar grupos de entidades (unidades taxonómicas, cepas) como nubes de puntos en una conformación espacial. Desde un punto de vista matemático, el PCA es el método de agrupamiento más auténtico y es un método excelente para discriminar entre dos a cinco grupos. Sin embargo, es menos apropiado para discriminar más de cinco grupos ya que las tres primeras dimensiones de un sistema multidimensional no permiten una representación satisfactoria de tales estructuras complejas (Versalovic *et al.* 1994; Rademaker y De Bruijn, 1997).

Análisis de *clusters*.

En contraste con el análisis de componentes principales, el análisis de *clusters* no reduce el número de caracteres sino que conlleva una reducción paso a paso del número de

objetos al integrarlos en grupos. El objetivo del proceso de *clustering* es agrupar los objetos en *clusters* o grupos de objetos similares. Dos objetos serán similares si están cerca en el espacio de caracteres. Un método de *clustering* comienza con tantos *clusters* como objetos haya (cada *cluster* contiene un solo objeto) y luego, secuencialmente, va uniendo objetos (o *clusters*) según su similitud, para formar nuevos *clusters*. Este proceso continúa iterativamente hasta que se obtiene un gran *cluster* que contiene todos los objetos. El resultado de este proceso se representa, generalmente, como un dendrograma, en el que se dibuja la unión secuencial de los *clusters* junto con el valor de similitud que lleva a esta unión. Por tanto, el primer paso en cualquier proceso de *clustering* es determinar la similitud entre cada par de objetos, comenzando por agrupar los objetos más parecidos entre sí. Para ello se requiere una medida de la similitud, existiendo un gran número de diferentes medidas que se pueden utilizar. También puede utilizarse como una medida de similitud la disimilitud o distancia entre dos objetos en el espacio de caracteres. Las distintas aproximaciones que existen para definir la similitud entre objetos y *clusters* de objetos y el algoritmo usado para calcular la nueva similitud es lo que se denomina el criterio de *clustering* o método de *clustering*.

El esquema general para el análisis de *clusters* requiere, en primer lugar, de una *Matriz de datos experimentales* que se transforma en una *Matriz de similitud* (o *matriz de distancias*) al aplicar algún algoritmo de similitud (o de distancias). Las medidas de similitud son generalmente medidas de distancia pero también pueden derivarse de coeficientes de correlación. En el caso de datos electroforéticos, la similitud entre dos objetos puede expresarse como la correlación entre sus patrones de bandas. Posteriormente, se lleva a cabo el *Clustering* propiamente dicho en donde la matriz de similitud (o de distancias) se utiliza para construir el *Dendrograma*. El dendrograma por sí mismo no define particiones o agrupamientos sino que estos se establecen al determinar un punto de corte (*cut-off value*) en algún valor óptimo para formar los *clusters*.

El resultado de un estudio de análisis de *clusters* puede depender de la medida de similitud usada y del método de *clustering* empleado, del conjunto de objetos estudiados, de los caracteres usados para describir los objetos y del peso relativo que se da a diferentes caracteres al calcular la similitud entre los objetos.

1.7.2. Análisis de *clusters* de datos de FAMES.

Según la mayoría de los autores ([Sasser, 1990a](#); [Sasser, 1990b](#); [Welch, 1991](#); [Vauterin et al., 1992](#); [Sasser, 1993](#); [Bowers et al., 1996](#); [Ndowora et al., 1996](#); [Vauterin et al., 1996](#); [Mergaert et al., 2001](#)), en el análisis de *clusters* de perfiles de ácidos grasos la medida más aplicada para calcular la matriz de distancias es la distancia euclidiana, seguido del método de UPGMA para construir el dendrograma. Sin embargo, la elección de la medida de distancia puede variar en función de los organismos estudiados ya que, como se ha comentado antes, dependiendo del método de *clustering* utilizado pueden variar los resultados y estos pueden ajustarse mejor a nuestros organismos objeto de estudio si

tenemos otra información adicional que lo apoye. Así, por ejemplo, otros autores han utilizado el coeficiente métrico Canberra y UPGMA (Heyrman *et al.*, 1999).

La utilización del método de UPGMA permite mostrar las similitudes a nivel de género, especie o subespecie. Sin embargo, algunos autores han criticado el uso de distancias euclidianas para la comparación y agrupamiento de cepas según sus perfiles de ácidos grasos, ya que su uso implica que el perfil global determina las similitudes que se establecen, y por tanto los ácidos grasos que se encuentran en mayor cantidad dan cuenta de la mayoría de la similitud o distancia, mientras que los ácidos grasos minoritarios, que pueden ser igual de útiles para la diferenciación, tienen un impacto pequeño o limitado en la similitud global. Además, algunos ácidos grasos son informativos como marcadores taxonómicos, mientras que otros varían de cepa a cepa. De esta forma, los datos sobre ácidos grasos que aportan información taxonómica relevante pueden estar enmascarados en un análisis de *clusters* basado en la similitud global. Por estas razones, solamente los taxones altamente característicos, es decir, aquellos taxones que tienen ácidos grasos que están presentes en grandes cantidades y que los diferencian de los otros grupos, podrían distinguirse claramente en un dendrograma (Vauterin *et al.*, 1996).

Por lo general, si se emplean distancias euclidianas, se establece como punto de corte para distinguir entre especies distancias menores de 10 (Sasser *et al.*, 1984; Ndowora *et al.*, 1996) y distancias de 6 unidades para las subespecies (Sasser, 1990b; Sasser, 1993).

1.7.3. Análisis de *clusters* de perfiles de amplificación o de restricción.

La matriz de semejanza o de distancia puede calcularse mediante un amplio abanico de coeficientes que comparan una o más de las características de los perfiles de amplificación y que dan como resultado unidades de similitud o de distancia. Los perfiles, en general, pueden analizarse según patrones basados en bandas o en curvas. Las bandas pueden usarse para caracterizar perfiles de amplificación bien definidos de poca complejidad bien como un conjunto de posiciones de picos solamente o bien añadiendo la altura o el área de cada pico. Cuando se usan métodos basados en bandas discretas, el conjunto de los perfiles de amplificación se puede describir como una matriz de variables binarias, banda presente=1, banda ausente=0. La información contenida en perfiles de amplificación de gran complejidad, como son los generados por rep-PCR, se obtiene por el número y la posición de los picos y por diferentes ratios en la altura de los picos y las áreas. De esta forma, un sistema binario no es suficiente para describir estos perfiles tan complejos. Preferiblemente, estos perfiles de amplificación se analizan usando un protocolo basado en la diferencia de las áreas bajo las curvas. Para poder analizar toda la información contenida en patrones de amplificación complejos, el método elegido debe basarse en las curvas densitométricas, descritas como un conjunto de valores de intensidad. En este caso, el coeficiente utilizado es el momento-producto o coeficiente de correlación de Pearson que permite la comparación directa de toda la curva densitométrica.

Coeficientes de proximidad.

El análisis de perfiles de amplificación complejos, generalmente requiere de una simplificación de los datos originales que pueden usarse para calcular la matriz de proximidad. Este cálculo puede basarse en criterios de similitud o de distancia, las cuales pueden calcularse con un amplio número de coeficientes.

El coeficiente de similitud definido por Jaccard (1908) se basa solamente en la presencia de una banda en una posición como una variable binaria, ignorando las negativas. Un coeficiente derivado del anterior y definido por Dice (1945) también utiliza la posición de la banda pero le da mayor peso a las bandas coincidentes. Al contrario que el coeficiente de Jaccard, el coeficiente de simple matching tiene en cuenta las coincidencias de bandas tanto positivas como negativas. En Bionumerics existe un coeficiente de similitud más sofisticado que es “sensible a las áreas” que tiene en cuenta la correspondencia de bandas expresada como en el coeficiente de Jaccard, así como las diferencias de las áreas relativas bajo cada una de las bandas correspondientes.

El momento-producto o correlación de Pearson es un coeficiente basado en curvas que se aplica al conjunto de valores densitométricos formado por el perfil de amplificación. El momento-producto es un coeficiente más robusto y objetivo ya que se compara la totalidad de la curva y se omite así la subjetividad de las bandas. Además, el momento-producto es independiente de las concentraciones relativas de los perfiles de amplificación y es bastante insensible a las diferencias en el fondo del gel. Los patrones tan complejos como los generados en muchos casos de ADN *fingerprinting*, como puede ser la rep-PCR, se benefician especialmente de estas propiedades del coeficiente de Pearson. Por todas estas razones, el coeficiente de correlación momento-producto de Pearson es más adecuado para la identificación de perfiles de amplificación de ADN que los algoritmos basados en la coincidencia de bandas. Hane y colaboradores (1993), al comparar las identificaciones obtenidas sobre los perfiles de amplificación cuando se aplicaba el coeficiente de correlación momento-producto de Pearson o cuando se utilizaban los algoritmos basados en la coincidencia de bandas vieron que el coeficiente de Pearson daba mejores resultados que los algoritmos basados en bandas y concluyeron que es más fiable que estos últimos porque se fija en el contorno completo de las curvas densitométricas y porque da mucho peso a las características mayores de las curvas como pueden ser los picos grandes o los grandes espacios sin picos.

Métodos de *clustering*.

El objetivo del análisis de *clusters* es encontrar grupos que contengan perfiles de amplificación similares de tal forma que los perfiles de amplificación incluidos en diferentes grupos sean lo menos similares como sea posible. Cuando el número de perfiles de amplificación a comparar es alto, la complejidad es mayor y por tanto son necesarios algoritmos matemáticos para poder realizar los análisis de clusters.

La elección de un método de *clustering* no es siempre obvia y depende de la naturaleza de los datos originales y del propósito del análisis. El análisis de *clusters*, así como el análisis de componentes principales (PCA), se utilizan mayoritariamente para describir, presentar y explicar los datos y no es un método estadístico para aprobar o desaprobado una hipótesis preconcebida. Existen diversos algoritmos en el análisis de *clusters* para generar dendrogramas (Jardine y Sibson, 1971). Un método frecuentemente usado es el descrito por Sneath y Sokal en 1973 denominado método no ponderado de agrupamiento por pares usando medias aritméticas (UPGMA). Este método es el más utilizado en el análisis de perfiles de amplificación (Versalovic *et al.* 1994; Versalovic y Lupski, 1998; Koeuth *et al.*, 1995; Louws *et al.* 1995; van Belkum *et al.* 1996).

Una descripción más detallada de los coeficientes de proximidad y de distancia se incluye en el **Anexo 6**.

Existen en el mercado diversos paquetes informáticos para analizar los datos de los perfiles de amplificación generados por los métodos de *fingerprinting* (Rementeria *et al.*, 2001) como Bionumerics (Applied Maths). En general, estos programas permiten la normalización de los perfiles de amplificación según patrones de tamaño en cada uno de los geles analizados (Versalovic *et al.*, 1994; Rossbach *et al.*, 1995; de Bruijn *et al.*, 1996a y 1996b; Schneider y de Bruijn, 1996). Otra de las ventajas de Bionumerics es que permite de forma sencilla construir dendrogramas resultantes de la combinación de diversos perfiles de amplificación, según la forma descrita por Rademaker y De Bruijn (1997) y Rademaker y colaboradores (1998). De esta forma, se consigue maximizar la especificidad de los patrones de amplificación, al generar una matriz combinada de varios métodos de *fingerprinting* para luego construir el dendrograma combinado (Louws *et al.*, 1995; Nick *et al.*, 1999).

1.7.4. Análisis de secuencias del gen 16S ARNr.

El análisis de secuencia se usa para dar información sobre la secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN. Existen varios programas para determinar el pariente más cercano según la secuencia de ADN. La mayoría de estos programas utilizan búsquedas de homología suministradas por BLAST (Altschul *et al.*, 1990 y 1997; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) o FASTA (Pearson y Lipman, 1988). Estos programas permiten una búsqueda de similitud rápida y fiable y además se pueden usar varias bases de datos para la comparación.

Construcción de árboles.

Es difícil visualizar las relaciones filogenéticas entre especies a partir de los valores numéricos basadas en múltiple comparaciones dos a dos, especialmente cuando se comparan muchas secuencias diferentes. Una forma alternativa de visualizar las relaciones filogenéticas es mediante la construcción de un árbol filogenético basado en los valores de identidad. Los cálculos para la construcción de árboles filogenéticos puede realizarse de dos maneras: mediante la matriz de distancias o mediante los datos de caracteres discretos. En la primera aproximación, los datos basados en las distancias evolutivas se disponen en una

matriz de distancias. La mayoría de los métodos de cálculo no ponderan cada mutación nucleotídica de la misma forma, sino que la estructura del ADN juega un papel importante en el cálculo. Se ha postulado que las transversiones son reconocidas con más facilidad por el sistema de reparación del ADN que las transiciones y por tanto, se considera que estos cambios son menos frecuentes y tienen una tasa de sustitución menor, lo que tiene que tenerse en cuenta a la hora de calcular los valores de distancia (Kimura, 1980). Otro ejemplo de diferencias en las tasas de sustitución se postula para los genes codificantes de proteínas. Las tasas de sustitución de la tercera posición nucleotídica en un triplete codificante de un aminoácido son generalmente más altas que en las otras dos posiciones nucleotídicas (Shoemaker y Fitch, 1989). Una característica más compleja es la formación de huecos (gaps). El coste de introducir un hueco en un alineamiento es generalmente mayor que la introducción de una sustitución de una base. Los modelos de cálculo de distancias utilizados con más frecuencia son los desarrollados por Jukes y Cantor (1969), Kimura (1980) y Tajima y Nei (1984). El modelo de Jukes y Cantor no discrimina entre diferentes sustituciones nucleotídicas, al contrario que el de Tajima y Nei, el cual, sin embargo, no hace correcciones para las transiciones o transversiones de nucleótidos, como sí lo hace el modelo de Kimura. El modelo de Jukes y Cantor ha sido probablemente el que se ha aplicado con más frecuencia en estudios evolutivos ya que se comporta bien en la mayoría de estudios que simulan la evolución de las secuencias de ácidos nucleicos.

Los árboles filogenéticos se pueden representar a partir de las matrices de distancias. Los modelos que calculan los árboles de distancias más comúnmente usados son el de UPGMA (Sokal y Michener, 1958) y el método de *neighbour joining* (unión al vecino) (Saitou y Nei, 1987). UPGMA es un método de *clustering* que empareja las secuencias con una menor distancia en un nodo y posteriormente empareja dos nodos en un nuevo nodo. El método de *neighbour joining* utiliza un algoritmo simplificado para calcular la longitud de las ramas y la topología del árbol.

Los cálculos de los datos de caracteres discretos no se basan en distancias evolutivas, pero consideran separadamente cada estado del carácter de una posición nucleotídica en una secuencia. Estos datos pueden procesarse de dos formas: la primera se basa en el principio de máxima parsimonia que considera que el árbol verdadero es el que requiere el menor número de cambios mutacionales para explicar las diferencias observadas entre las secuencias de los genes (Edwards y Cavalli-Sforza, 1965). La segunda forma de manejar los datos de caracteres discretos es la denominada filogenia de máxima probabilidad (maximum likelihood). Este método utiliza modelos estadísticos para calcular la probabilidad de que una secuencia se convierta en otra secuencia por mutaciones a lo largo del tiempo (Felsenstein, 1973 y 1981).

Tabla 4: Resumen de los diferentes métodos para calcular las relaciones filogenéticas y para la construcción de árboles filogenéticos.

Construcción del árbol	Base del cálculo	Referencia
Matriz de distancias	Cada nucleótido cambia por igual	Jukes y Cantor (1969)
	Diferentes tasas de sustitución	Tajima y Nei (1984)
	Diferentes tasas de sustitución y corrección para transversiones/transiciones	Kimura (1980)
Datos de caracteres discretos	Máxima parsimonia	Edwards y Cavalli-Sforza (1965)
	Máxima verosimilitud	Felsenstein (1973 y 1981)

_____ ***Objetivos*** _____

2. OBJETIVOS

2.1. Antecedentes.

El análisis empírico de grandes poblaciones bacterianas empleado para el descubrimiento de nuevos metabolitos secundarios, apoyada hoy en día por los estudios genómicos, indica que el potencial genético para producir metabolitos secundarios no está uniformemente distribuido a lo largo de los diversos taxones bacterianos, ni siquiera es una característica uniforme dentro del *Phylum* “*Actinobacteria*”. La producción de metabolitos secundarios parece estar asociada mayoritariamente a determinadas familias, obteniéndose los productores más prolíficos de metabolitos secundarios dentro del *Phylum* “*Actinobacteria*” en cepas con micelio filamentosos y con un tamaño de genoma grande (Busti *et al.*, 2006). Una aproximación para la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos producidos por microorganismos puede enfocarse en el aislamiento de microorganismos minoritarios o de difícil cultivo, asociados filogenéticamente con grupos taxonómicos productores de metabolitos secundarios (Donadio *et al.*, 2005) a partir de entornos o nichos ecológicos poco explorados (líquenes, rizosferas, endofitos, piedras, sedimentos e invertebrados marinos, etc.) con el fin de obtener nuevas comunidades microbianas que produzcan nuevas estructuras químicas (Donadio *et al.*, 2002b; Whitaker *et al.*, 2003; Strobel y Daisy, 2003; Clardy *et al.*, 2006; Genilloud *et al.*, 2011). Además, las nuevas aproximaciones genómicas han revelado la presencia de numerosos clusters de genes crípticos que codifican presumiblemente productos naturales (Busti *et al.*, 2006; Davies y Ryan, 2011; Genilloud *et al.*, 2011; Oves-Costales y Challis, 2012) y han demostrado que la capacidad de los actinomicetos para producir antibióticos y otros productos naturales bioactivos parece haber sido enormemente subestimada (Kaeberlein *et al.*, 2002; Zazopoulos *et al.*, 2003), hasta tal punto que diversos modelos matemáticos predicen que el número de antibióticos no descubiertos a partir de actinomicetos podría ser del orden de 10^7 (Watve *et al.*, 2001).

Con estos planteamientos anteriores, nuestra estrategia para el trabajo realizado se ha basado en la hipótesis de que microhábitats poco estudiados en cuanto a las comunidades microbianas que los habitan, como son los líquenes, son una fuente de nuevos actinomicetos con diversidad metabólica que derive en la capacidad de producir nuevos metabolitos bioactivos (Okoro *et al.*, 2009).

2.2. Objetivo general.

El objetivo principal del proyecto es la evaluación de la diversidad de cepas aisladas de líquenes procedentes de diferentes entornos geográficos, empleando una aproximación polifásica que permita estudiar el nivel de discriminación entre las cepas de grupos taxonómicos mayoritarios de actinomicetos. Los métodos de análisis se basan tanto en criterios morfológicos, quimiotaxonómicos y genómicos, como en técnicas moleculares que

puedan revelar la presencia y distribución de genes implicados o relacionados con la síntesis de compuestos bioactivos, principalmente NRPS, PKS-I y PKS-II que permitan conocer el potencial metabólico de los microorganismos.

2.3. Objetivos específicos.

Con el fin de alcanzar el objetivo general, se plantean los siguiente objetivos específicos:

- 1.-** Aislamiento de las comunidades cultivables de actinomicetos que habitan en líquenes recolectados en Alaska, Hawai y Reunión mediante el empleo de métodos generales y específicos de aislamiento de actinomicetos.
- 2.-** Caracterización quimiotaxonómica de las cepas aisladas analizando la composición de sus ácidos grasos mediante cromatografía de gases.
- 3.-** Determinación de la diversidad y la posición taxonómica de una selección de cepas mediante secuenciación del gen ribosomal 16S ADNr.
- 4.-** Evaluación de la capacidad de resolución taxonómica que presentan distintos métodos de *fingerprinting* para poder evaluar la diversidad genotípica de los taxones estudiados. Las técnicas de *fingerprinting* empleadas son: IGS16S-23S-PCR, tADN-PCR, BOX-PCR, REP-PCR, ERIC-PCR y (GTG)₅-PCR.
- 5.-** Analizar el potencial biosintético mediante el estudio de la presencia y distribución de sistemas PKS-I, PKS-II, NRPS, APH y HMG CoA reductasa en los diferentes grupos de actinomicetos.
- 6.-** Estudiar la diversidad de las rutas biosintéticas mediante el análisis de los perfiles de restricción de los productos detectados (RFLP *fingerprinting*).
- 7.-** Determinar capacidad de las cepas para producir algún compuesto con actividad antimicrobiana frente a un panel de distintos microorganismos (bacterias Gram positivas y Gram negativas y hongos).
- 8.-** Estudiar la relación entre la presencia de los sistemas biosintéticos y la actividad antimicrobiana.
- 9.-** Estudiar la producción de metabolitos secundarios mediante LC-MS y la actividad antimicrobiana de las cepas de la familia *Pseudonocardiaceae* cultivadas en medios líquidos y medios sólidos.

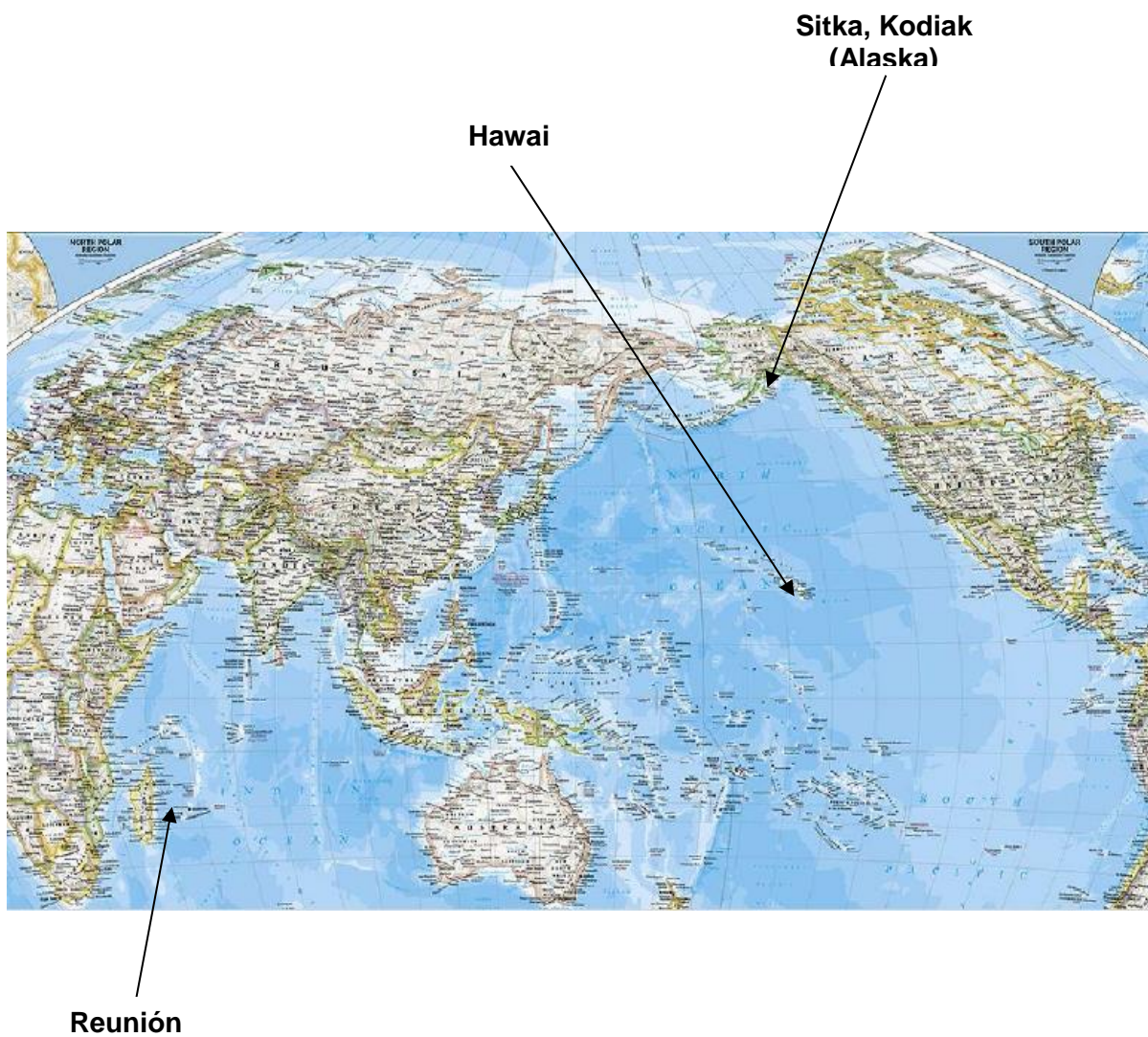
_____Materiales y Métodos _____

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Origen de las muestras.

Las muestras de líquenes se recolectaron en Alaska, en las islas de Sitka y Kodiak y zonas tropicales de las islas de Reunión y de Hawai (**Figura 3** y **Tabla 12** p. 102).

Figura 3: Localización geográfica de las zonas de muestreo de los líquenes.



3.2. Aislamiento de actinomicetos.

3.2.1. Métodos de aislamiento.

3.2.1.1. Método de Dilución (DIL).

La superficie de cada liquen (300-500 mg) se lavó dos veces con agua estéril y después se homogenizaron con 30 ml de agua estéril con una batidora. Diluciones seriadas de los homogenizados (0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}) se sembraron (10 y 100 μ l) en medios de aislamiento selectivos para actinomicetos, suplementados con cicloheximida (80 μ l/ml) y, con ácido nalidíxico (20 μ l/ml) o alternativamente con novobiocina (20 μ l/ml) ([Hayakawa y Nonomura, 1989](#)).

3.2.1.2. Pretratamiento con calor seco (HOT).

Como método alternativo, los líquenes se desecaron tratándolos con calor seco a 100°C durante una hora antes de homogenizarse y sembrarse como se ha descrito antes.

3.2.1.3. Pretratamiento con Cloruro de Bencetonio (BC) y Gluconato de Clorhexidina (GC).

El aislamiento selectivo de actinomicetos pertenecientes a los géneros *Streptosporangium* y *Microbispora* está basado en el diferente grado de resistencia a agentes tóxicos y a antibióticos manifestados por estos géneros. Ambos métodos fueron descritos en 1991 por Hayakawa y colaboradores ([1991a](#) y [1991b](#)) y se han adaptado a las características de los diferentes sustratos utilizados en el aislamiento.

Protocolo:

1) Se homogenizaron 200-500 mg de muestra en 10 ml de agua, y tras sonicar 2 min., se dejó sedimentar y se recogió el sobrenadante.

2) Se preparó para cada uno de los tratamientos (BC o GC):

solución BC: solución al 0.01% de cloruro de bencetonio en tampón fosfato 5 mM pH 7.0 (para preparar 50 ml de cloruro de bencetonio al 0.01%, se disuelven 5 mg de cloruro de bencetonio en 50 ml de tampón fosfato 5 mM pH 7.0).

solución GC: solución al 0.03% de gluconato de clorhexidina en tampón fosfato 5 mM pH 7.0 (para preparar 50 ml de gluconato de clorhexidina al 0.03%, diluir 75 μ l de gluconato de clorhexidina en 50 ml de tampón fosfato 5 mM pH 7.0).

3) Se añadieron 0,5 ml del sobrenadante (conteniendo las esporas y propágulos en suspensión) a 4,5 ml de solución BC o de solución GC en función del tratamiento, y se incubó a 28° C durante 30 min.

- 4) Se centrifugó 15 min. a 10.000 rpm y se resuspendió el sedimento en 1 ml de agua estéril.
- 5) 10 y 100 µl de las diluciones (0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4}) se plaquearon en los medios de cultivo suplementados con antibióticos.

3.2.2. Medios de aislamiento.

Todos los medios de aislamiento empleados se suplementaron con cicloheximida (80 µg/ml) y adicionalmente, con ácido nalidíxico (20 µg/ml) o con novobiocina (20 µg/ml) (Hayakawa y Nonomura, 1989).

Medio SE-2 (Hayakawa *et al.*, 2000)

Se añadieron 200 g de tierra de jardín en 1000 ml de agua y se autoclavó. Después de autoclavar se filtró, se dejó reposar en nevera 2 días y se filtró con papel filtro Whatman N°1 con ayuda de una bomba de vacío. Se ajustó a pH 7,0. Se añadieron 15 g de agar y 5ml de Benomil (500mg/125ml H₂O) y se enrasó hasta 1 litro con agua destilada. Después de autoclavar, se añadieron:
8 ml de cicloheximida 1% y 4 gotas de Dieldrin (stock 2g/100ml acetona)

Medio HANOB

Es una modificación del medio Ágar ácido húmico-vitaminas (Hayakawa y Nonomura, 1987a y 1987b)

NaNO ₃	6,25 g
K ₂ HPO ₄	2,50 g
MgSO ₄	0,65 g
Ácido húmico, sal sódica (Aldrich 1415-93-6)	1,25 g
Agar	15 g
Benomil (500mg/125ml H ₂ O)	5 ml (equiv 5 ppm)
H ₂ O destilada	1000 ml
pH 7,0	

Después de autoclavar, se añadió:

8 ml de cicloheximida 1% y 4 gotas de Dieldrin (stock 2g/100ml acetona)

Medio NZ

NZ amine A	0,2 g
Agar Noble (Sigma A7002)	15 g
Agua del grifo	1000 ml
Benomil (500mg/125ml H ₂ O)	5 ml (equiv 5 ppm)

Después de autoclavar, se añadió:

8 ml de cicloheximida 1% y 4 gotas de Dieldrin (stock 2g/100ml acetona)

3.2.3. Mantenimiento y preservación de cultivos.

Las placas de aislamiento se incubaron a 28°C durante unas 3 semanas o hasta que se visualizaron las colonias de actinomicetos. Tras este período de tiempo se aislaron todas las colonias de actinomicetos que se transfieren a placas de YME agar (4 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de extracto de malta, 4 g/l de glucosa, 20 g/l de agar).

. Estas placas se incubaron durante aproximadamente una semana a 28°C hasta que vimos que la colonia transferida había producido suficiente biomasa, momento en el que extendimos la colonia con ayuda de una torunda sobre la superficie de la placa. Las placas se volvieron a incubar a 28°C durante una o dos semanas adicionales hasta que produjeron suficiente biomasa.

Los cultivos seleccionados se preservaron en forma de 2 viales con 5 tacos de agar cogidos con ayuda de un *transfer tube* que se transfirieron a un criotubo de 2 ml que contenía 1,2 ml de glicerol 10%. Estos criotubos se conservaron a -80°C.

3.3. Identificación morfológica.

Los actinomicetos aislados se identificaron a nivel de género o de familia mediante observación al microscopio (aumentos de 400x y 1000x) de la morfología del micelio aéreo y/o vegetativo desarrollados al crecer en el medio agua-agar (Hunter-Cervera *et al.*, 1986) durante 21 días a 28°C (Tabla 13, p103).

3.4. Análisis de ácidos grasos (FAMES) mediante cromatografía de gases.

Las cepas aisladas se crecieron formando un cultivo continuo en el medio TSBA (30 g/l de *Trypticase Soy Broth* BBL#11768 y 15 g/l de agar) durante 4 días a 28°C. El micelio vegetativo (100-200 mg) se rascó de la placa con el borde afilado de una espátula procurando arrastrar la menor cantidad posible de agar. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES) se prepararon usando el método recomendado por MIDI en su Nota Técnica 101 (Sasser, 1990a) que es una modificación de los métodos descritos por Miller (1982), Sasser y colaboradores (1984) y Stead y colaboradores (1992). La preparación de las muestras para el análisis de los ácidos grasos consiste en la hidrólisis de los ácidos grasos celulares totales para formar las sales sódicas y luego en la metilación para formar los ésteres de los ácidos grasos para hacerlos más volátiles. Una vez recogido el micelio (unos 50 mg, peso húmedo) tras su incubación durante 4 días a 28°C, se produce la saponificación mediante una solución de hidróxido sódico y metanol durante 30 min a 100°C. Esto hace que se liberen los ácidos grasos de sus lípidos celulares. El segundo paso es la metilación con ácido clorhídrico en metanol durante 80°C \pm 1°C durante 10 min \pm 1 min. Tercero, extracción de los ésteres metílicos de los ácidos grasos con una mezcla de hexano y metil-tert-butil-éter (1:1) durante 10 min, agitando con suavidad. Finalmente el extracto se lava con una solución acuosa de NaOH durante 5 min. El extracto se transfiere a un vial de cromatografía para su posterior análisis, o se conserva a -20°C hasta su análisis (Welch, 1991).

El análisis de los FAMES se llevó a cabo mediante cromatografía de gases capilar usando un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard modelo 5890 con automuestreador. La separación se realizó con una columna capilar de 25 m de sílice fundida rellena de 5% metil-fenil-silicona (Hewlett-Packard Ultra-2, 19091B-102) y la detección se hizo con un detector de ionización de llama (FID) usando hidrógeno como gas portador (con un flujo de 30 ml/min en el FID, 55 ml/min en el venteado del *split* y 5 ml/min en el purgado del *septum*), nitrógeno como gas auxiliar (con un flujo de 30 ml/min en el FID) y aire (con un flujo de 400 ml/min en el FID). La temperatura del inyector fue de 250°C y la del detector 300°C. La temperatura del horno se incrementó 5°C/min desde 170°C al inicio del análisis hasta llegar a los 270°C. Dos µl de la muestra se inyectaron en la columna (con una relación 1:100 de *split*). La secuencia de las muestras, las condiciones cromatográficas, la secuencia del patrón de calibración, la integración de picos, la identificación y cuantificación de los mismos estuvieron controladas automáticamente por el *software* del *Microbial Identification System* (MIDI). El patrón de calibración contenía una mezcla conocida de ácidos grasos, incluyendo todos los ácidos grasos saturados y lineales entre 9 y 20 átomos de carbono de longitud de cadena y 5 FAMES hidroxilados. Los FAMES individuales fueron identificados usando el programa informático *Microbial Identification Software* (MIS) de MIDI (MIDI, Inc. Newark, DE, USA).

3.5. Técnicas genotípicas basadas en los perfiles de amplificación mediante PCR.

3.5.1. Extracción del ADN.

El ADN molde se obtuvo de los cultivos de actinomicetos crecidos en el medio líquido ATCC-2 (5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NZamina EKC, 3 g/l de extracto de carne, 5 g/l de peptona, 1 g/l de dextrosa, 2 g/l de almidón de patata y 1 g/l de CaCO₃ (añadido después de medir el pH)) y se purificó siguiendo una modificación del protocolo descrito por Innis y colaboradores (1990) y que se describe a continuación:

De los cultivos axénicos crecidos en el medio ATCC-2 se recogieron 1,2 ml de suspensión de micelio en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. Estos se centrifugaron a 13.000 rpm (Biofuge-fresco, Heraeus), 15 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante, conservando el micelio sedimentado a -20°C para la posterior extracción de ADN. El material celular recogido se resuspendió en 800 µl de *buffer* de extracción (50 mM EDTA pH 8,5; 0,2% SDS) y se incubó a 70°C durante 30 minutos en un termobloque (Multi-Block, Lab-Line). Después se centrifugó a 13.000 rpm, 4°C durante 15 minutos para eliminar restos celulares. El sobrenadante resultante se transfirió a un nuevo tubo de 1,5 ml (Eppendorf) con 60 µl de acetato potásico (CH₃CO₂K) 3 M, pH 5,2. Se incubó a -20°C durante 15-20 min. A continuación se centrifugó en las condiciones anteriores y se pasaron 500 µl de sobrenadante a un nuevo tubo con 1 ml de etanol al 96%. Se incubó a -20°C de 2-5 horas; se centrifugó y se descartó el sobrenadante. Se lavó de nuevo con etanol al 70%, se centrifugó y se dejó evaporar el etanol en el termobloque a 37°C. Una vez seco, el sedimento se resuspendió en 50-100 µl de agua Milli-Q estéril según la cantidad visual de ADN.

3.5.2. Amplificación del ADN mediante PCR para la caracterización de cultivos (PCR fingerprinting).

Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador modelo MJ Research PT-200, equipado con tapa caliente. Con el fin de obtener la mayor reproducibilidad se estandarizaron el mayor número posible de variables en cada una de las distintas técnicas analizadas (*Taq* polimerasa, dNTPs, *buffer*, condiciones electroforéticas, etc.).

3.5.2.1. Amplificación de la región intergénica 16S-23S (IGS-PCR).

Esta técnica permite analizar el número y tamaño de las regiones intergénicas ubicadas entre los genes 16S y 23S rRNA de los distintos operones presentes en el genoma. La amplificación se realizó utilizando los oligonucleótidos: G1 (5'-GAAGTCGTAACAAGG-3') y L1 (5'-CAAGGCATCCACCGT-3') descritos por Jensen y colaboradores (1993). Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µl conteniendo cada una de ellas 0,2 mM de cada uno de los cuatro dNTPs (GeneAmp® dNTPs, Applied Biosystems N808-0007), 1 µM de cada oligonucleótido, 5 µl de una dilución 1/100 del extracto de ADN y 1 unidad de *Taq* polimerasa (MP-1000U 5 U/µl Cat EPTQA100) con su correspondiente tampón de reacción (10 mM Tris HCl, pH 9,0, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,1% Tritón X-100, 0,2 mg/ml BSA). En cada experimento de PCR, se incluyeron controles a los que no se les añadió ADN bacteriano. Las condiciones de amplificación fueron (i) 5 min a 95°C; seguido por (ii) 30 ciclos a 94°C durante 30 s, 30 s a 55°C y 2 min a 72°C; y (iii) seguido al final por un ciclo de 10 min a 72°C, (iv) para pasar finalmente a 4°C.

3.5.2.2. ADNt-PCR.

Los oligonucleótidos T5A (5'-AGTCCGGTGCTCTAACCAACTGAG-3') y T3B (5'-AGGTCGCGGGTTCTGAATCC-3') se utilizaron para la amplificación de las regiones situadas entre genes adyacentes de los ARNt (Welsh y McClelland, 1991 y 1992; Hirsch y Sigmund, 1995). Las reacciones de amplificación fueron iguales a las descritas en el apartado anterior con la excepción de los oligonucleótidos empleados. Las condiciones de amplificación fueron (i) 5 min a 95°C; seguido por (ii) 30 ciclos a 94°C durante 30 s, 30 s a 50°C y 2 min a 72°C; y (iii) seguido al final por un ciclo de 10 min a 72°C, (iv) para pasar finalmente a 4°C.

3.5.2.3. rep-PCR: REP-PCR, ERIC-PCR, BOX-PCR y (GTG)₅-PCR.

Esta técnica consiste en la amplificación por PCR de fragmentos palindrómicos repetitivos extragénicos. Los protocolos de amplificación mediante PCR con los cebadores REP, ERIC, BOX y (GTG)₅ se denominan respectivamente REP-PCR, ERIC-PCR, BOX-PCR y (GTG)₅-PCR y en su conjunto como rep-PCR (Versalovic *et al.*, 1991, 1994, 1998a y 1998b; Louws *et al.*, 1995).

Las secuencias de los cebadores correspondientes al elemento REP son las siguientes:

- REP1R-I (5'-IIICGICGICATCIGGC-3')
- REP2-I (5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3')

Las secuencias de los cebadores correspondientes al elemento ERIC son las siguientes:

- ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3')
- ERIC2 (5'-AAGTAAGTGAAGGGGTGAGCG-3')

La secuencia del cebador correspondiente al elemento BOX es la siguiente:

- BOXA1R (5'-CTACGGCAAGGCGACGCTGACG-3')

La secuencia del cebador correspondiente al politrinucleótido (GTG)₅ es la siguiente:

- (GTG)₅ (5'-GTGGTGGTGGTGGTG-3')

La mezcla de reacción de 20 µl para cada una de las muestras contiene 5 µl del tampón 5X Gitschier (Louws *et al.*, 1995; Rademaker y De Bruijn, 1997), 0,2 µl de BSA (20 mg/ml), 2,5 µl de DMSO 100% (v/v), 1,25 mM de cada uno de los cuatro dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) (Roche), 1 µM de cada oligonucleótido (1 µl de cada uno de los cebadores REP1R y REP2-I o de ERIC1R y ERIC2 o 1 µl del cebador BOXA1R y del cebador (GTG)₅, a una concentración cada uno de 0,3 µg/µl), 2 unidades de Taq polimerasa (0,4 µl de una concentración de 5 U/µl) (MP-1000U 5 U/µl Cat EPTQA100). A cada mezcla de reacción se le añaden 5 µl de una dilución 1/100 del extracto de ADN genómico de cada muestra.

Los parámetros de amplificación fueron los siguientes: (i) un ciclo inicial de desnaturalización de 7 min a 95°C seguido de (ii) 30 ciclos que constaban de una etapa de desnaturalización de 1 min a 94 °C, seguido de la fase de apareamiento de 1 min a 40°C para la pareja de cebadores REP y para el cebador (GTG)₅, 52°C para la pareja de cebadores ERIC y 53°C para el cebador BOX, seguido de la fase de extensión de 8 min a 65°C, (iii) seguido de una etapa final, al final de los ciclos, de 16 min a 65°C, (iv) para pasar finalmente a 4°C.

Tabla 5: Secuencias de los oligonucleótidos empleados para el análisis de PCR-*fingerprinting*.

	Secuencia del Oligonucleótido (5' → 3')
IGS-PCR	G1: 5'-GAA GTC GTA ACA AGG-3' L1: 5'-CAA GGC ATC CAC CGT-3'
ADNt-PCR	T5A: 5'-AGT CCG GTG CTC TAA CCA ACT GAG-3' T3B: 5'-AGG TCG CGG GTT CGA ATC C-3'
REP-PCR	REP1R-I: 5'-III ICG ICG ICA TCI GGC-3' REP2-I: 5'-ICG ICT TAT CIG GCC TAC-3'
ERIC-PCR	ERIC1R: 5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCAC-3' ERIC2: 5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3'
BOX-PCR	BOXA1R: 5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3'
(GTG)₅-PCR	(GTG)₅ 5'-GTG GTG GTG GTG GTG-3'

Tabla 6: Volúmenes empleados para cada análisis de PCR-*fingerprinting* (valores expresados en µl).

IGS-PCR / ADNt-PCR		REP-PCR / ERIC-PCR		BOX-PCR / (GTG) ₅ -PCR	
REACCION DE PCR		REACCION DE PCR		REACCION DE PCR	
10x tampón estándar	2,5	5X tampón Gitschier	5	5X tampón Gitschier	5
dNTPs (10mM)	2	DMSO puro 10%	2,5	DMSO puro 10%	2,5
Oligo 1 (100µM)	0,25	BSA 20mg/ml	0,2	BSA 20mg/ml	0,2
Oligo 2 (100µM)	0,25	dNTPs (10mM)	10,3	dNTPs (10mM)	11,3
Taq DNA Pol	0,2	Oligo 1 (100µM)	1	Oligo (100µM)	1
H ₂ O	15	Oligo 2 (100µM)	1	Taq DNA Pol	0,4
Vol. Master mix	20	Taq DNA Pol	0,4	Vol. Master mix	20
ADN 1/100	5	Vol. Master mix	20	ADN 1/100	5
		ADN 1/100	5		

Tabla 7: Parámetros de amplificación empleados para cada análisis de PCR-*fingerprinting*.

IGS-PCR	ADNt-PCR	REP-PCR
5min - 95°C	5min - 95°C	7min - 95°C
30s - 95°C	30s - 95°C	1min - 94°C
30s - 55°C	30s - 50°C	1min - 40°C
2min - 72°C	2min - 72°C	8min - 65°C
10min - 72°C	10min - 72°C	16min - 65°C
30 ciclos	30 ciclos	30 ciclos

ERIC-PCR	BOX-PCR	(GTG) ₅ -PCR
7min - 95°C	7min - 95°C	7min - 95°C
1min - 94°C	1min - 94°C	1min - 94°C
1min - 52°C	1min - 53°C	1min - 40°C
8min - 65°C	8min - 65°C	8min - 65°C
16min - 65°C	16min - 65°C	16min - 65°C
30 ciclos	30 ciclos	30 ciclos

3.5.3. Detección de secuencias específicas de genes biosintéticos: sistemas PKS-I, PKS-II, NRPS, APH y HMG CoA reductasa.

Como en el caso de los análisis de PCR-*fingerprinting*, todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador modelo MJ Research PT-200, equipado con tapa caliente, estandarizándose también en este caso el mayor número posible de variables (*Taq* polimerasa, dNTPs, *buffer*, condiciones electroforéticas, etc.).

Para la detección de la presencia de los genes biosintéticos hemos utilizado 5 parejas distintas de oligonucleótidos para PCR:

- A3F (5'-GCSTACSYSATSTACACSTCSGG-3') y A7R (5'-SASGTCVCCSGTSCGGTAS-3') específicos para secuencias NRPS ([Ayuso-Sacido y Genilloud, 2005](#));
- K1F (5'-TSAAGTCSAACATCGGBCA-3') y M6R (5'-CGCAGGTTSCSGTACCAGTA3') dirigidos a secuencias PKS-I ([Ayuso-Sacido y Genilloud, 2005](#));
- KS α (5'-TSGRCTACRTCAACGGSCACGG-3') y KS β (5'-TACSAGTCSWTCGCCTGGTTC-3') dirigidos a secuencias PKS-II ([Ayuso et al., 2005](#));
- STR-F (5'-CGGCTGCTCGACCACGAC-3') y STR-R (5'-GTCCTCGATGTCCCACAG-3') dirigidos a secuencias APH ([Anderson et al., 2002](#));
- HMGF (5'-GGGCATCGCCGCGACCCTCGTCGACGAGCG-3') y HMGR (5'-GCGATGACGGCGAGGCGGGCGGCGTTCTC-3') dirigidos a secuencias de la HMG CoA reductasa ([Sigmund et al., 2003](#)).

Los ADN purificados se utilizaron como molde para la reacción de amplificación de la *Taq* polimerasa. Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen de 50 μ l que contenía 0,4 μ M de cada oligonucleótido, 0,2 mM de cada dNTPs (Roche), 5 μ l de cada extracto de ADN, 1 U de *Taq* polimerasa (MP-1000U 5 U/ μ l Cat EPTQA100) en tampón de reacción recomendado por el fabricante y 10% de DMSO.

Los parámetros de amplificación fueron los siguientes: (i) un ciclo inicial de desnaturalización de 5 min a 95°C seguido de (ii) 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 2 min a 55°C para la pareja K1F/M6R, 58°C para la pareja KS α /KS β y 61°C para la pareja A3F/A7R y 4 min a 72°C, (iii) seguido de 10 min a 72°C al final de los ciclos, (iv) para pasar finalmente a 4°C. Las amplificaciones con los oligonucleótidos STR-F/STR-R y HMGF/HMGR se realizaron según se ha descrito con anterioridad ([Huddleston et al., 1997](#); [Anderson et al., 2002](#); [Sigmund et al., 2003](#)): (i) un ciclo inicial de desnaturalización de 5 min a 95°C seguido de (ii) 35 ciclos que constaban de una etapa de desnaturalización de 1 min a 94 °C, seguido de la fase de apareamiento de 1 min a 55°C para la pareja de cebadores STR-F/STR-R, 62°C para la

pareja de cebadores HMGF/HMGR seguido de la fase de extensión de 1 min a 72°C, (iii) seguido de una etapa final, al final de los ciclos, de 10 min a 72°C, (iv) para pasar finalmente a 4°C.

Tabla 8: Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la detección de secuencias específicas de genes biosintéticos.

	Secuencia del Oligonucleótido (5'→ 3')	Tamaño de banda (pb)
PKS-I	K1F: 5'-TSA AGT CSA CAT CGG BCA-3'	1250-1400
	M6R: 5'-CGC AGG TTS CSG TAC CAG TA-3	
PKS-II	KSαF: 5'-TSG RCT ACR TCA ACG CSC ACG G-3'	800-900
	KSβR: 5'-TAC SAG TCS WTC GCC TGG TTC-3'	
NRPS	A3F: 5'-GCS TAC SYS ATS TAC ACS TCS GG-3'	700
	A7R: 5'-SAS GTC VCC SGT SCG GTA S-3'	
STR	STR-F: 5'-CGG CTG CTC GAC CAC GAC-3'	600
	STR-R: 5'-GTC CTC GAT GTC CCA CAG-3'	
HMG	HMGF: 5'-GGG CAT CGC CGC GAC CCT CGT CGA CGA GCG-3'	900
	HMGR: 5'-GCG ATG ACG GCG AGG CGG CGG GCG TTC TC-3'	

Tabla 9: Volúmenes empleados para la detección de secuencias específicas de genes biosintéticos (valores expresados en µl).

PKS-I / PKS-II / NRPS		STR / HMG	
REACCION DE PCR		REACCION DE PCR	
10x tampón estándar	5	10x tampón estándar	5
DMSO puro 10%	5	DMSO puro 10%	5
dNTPs (10mM)	4	dNTPs (10mM)	4
Oligo directo (100µM)	0,25	Oligo directo (100µM)	0,3
Oligo reverso (100µM)	0,25	Oligo reverso (100µM)	0,3
Taq DNA Pol	0,2	Taq DNA Pol	0,2
H ₂ O	30,3	H ₂ O	30,2
Vol. Master mix	45	Vol. Master mix	45
ADN 1/100	5	ADN 1/100	5

Tabla 10: Parámetros de amplificación empleados para la detección de secuencias específicas de genes biosintéticos.

PKS-I		PKS-II		NRPS	
5min - 95°C	35 ciclos	5min - 95°C	35 ciclos	5min - 95°C	35 ciclos
30s - 95°C		30s - 95°C		30s - 95°C	
2min - 55°C		2min - 58°C		2min - 61°C	
4min - 72°C		4min - 72°C		4min - 72°C	
10min - 72°C		10min - 72°C		10min - 72°C	

STR		HMG	
5min - 95°C	35 ciclos	5min - 95°C	35 ciclos
1min - 94°C		1min - 94°C	
1min - 55°C		1min - 62°C	
1min - 72°C		1min - 72°C	
10min - 72°C		10min - 72°C	

3.5.3.1. Digestión con la enzima *Hin* F1 de los productos de amplificación de los sistemas PKS-I, PKS-II y NRPS.

Los productos de amplificación se purificaron con el *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (27-9602-01; Amersham Pharmacia Biotech) para su posterior digestión con la enzima *Hin*F1 (Cat# E1061V, 1000 unidades; Amersham Pharmacia Biotech).

Las condiciones de digestión fueron las siguientes:

1. En un eppendorf se añadió:

Agua milli-Q estéril	16 µl
10X <i>Buffer</i>	2 µl
DNA	2 µl
<i>Hin</i> F1	0,2 µl

2. Se incubó 1 hora a 37°C.
3. Se cargaron 15 µl en un gel de acrilamida en gradiente 4-20%

3.5.4. Análisis de los perfiles electroforéticos.

3.5.4.1. Geles de poliacrilamida.

Los productos de amplificación obtenidos en cada una de las técnicas de PCR-*fingerprinting* descritas anteriormente se separaron mediante electroforesis en minigeles de poliacrilamida en gradiente del 4-20 % (TBE Criterion gels Bio-Rad 345-0060, Hercules, CA, USA) y se visualizaron después de ser teñidos durante 15 min con 0,5 mg/ml de bromuro de etidio. En cada gel se cargaron 3 carriles con 5 µl de un marcador de tamaño de 50-2000 pb (Amplisize Molecular Ruler, 170-8200B, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) para poder posteriormente normalizar las imágenes de los geles y comparar entre sí los perfiles electroforéticos obtenidos en diferentes geles. Las imágenes de los geles se obtuvieron y almacenaron usando el analizador de imágenes Image Master analyzer (Pharmacia-Biotech) y se guardaron en formato TIFF.

3.5.4.2. Geles de agarosa.

Los productos de amplificación obtenidos con los oligonucleótidos específicos para la detección de las distintas rutas biosintéticas o de genes de resistencia se visualizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,2 % (Ready-To-Run 48 well 1,2% agarose gel, 80-6461-71, Amersham Pharmacia Biotech) que contenían bromuro de etidio

3.5.5. Secuenciación del gen ribosomal 16S rADN y análisis filogenético.

El ADN genómico de las cepas salvajes seleccionadas se utilizó como molde para la amplificación parcial del gen 16S ARNr, mediante el empleo de los oligonucleótidos fD1 (Weisburg *et al.*, 1991) y 1110r (Lane, 1991). Las reacciones de PCR se realizaron siguiendo los parámetros de amplificación siguientes: (i) un ciclo inicial de desnaturalización de 5 min a 95°C seguido de (ii) 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 2 min a 53°C y 4 min a 72°C, (iii) seguido de 10 min a 72°C al final de los ciclos, (iv) para pasar finalmente a 4°C.

Los productos de amplificación se purificaron con el *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (27-9602-01; Amersham Pharmacia Biotech). Los productos de PCR purificados fueron enviados a Genewiz (GENEWIZ, Inc. South Plainfield, NJ) para su secuenciación. Los fragmentos de ADN se secuenciaron usando el *ABI PRISMDYE Terminator Cycle sequencing Kit* y los fragmentos se resolvieron usando un *ABI3130 genetic analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para cada producto de amplificación se secuenciaron las dos hebras usando los mismos oligonucleótidos usados para la amplificación inicial.

Las secuencias parciales, de unos 900-1000 nt, se ensamblaron y editaron con la aplicación *Assembler*, incluido en el programa Bionumerics (ver 5.10) para su posterior análisis y alineamiento. El alineamiento múltiple de las secuencias se realizó usando el programa CLUSTALX (Thompson *et al.*, 1997), integrado en el programa MEGA versión 5.05. (Tamura *et al.*, 2011) aplicando los parámetros por defecto empleados en CLUSTALX.

Posteriormente, los alineamientos de las secuencias nucleotídicas se revisaron visualmente para identificar posiciones con un alineamiento dudoso, principalmente en los extremos de las secuencias, y así poder corregirlas u omitirlas siguiendo las recomendaciones de Tindall y colaboradores (2010). Una vez alineadas, las secuencias se recortaron en sus extremos dejando unos 900 nt que incluían alrededor la posición 100 hasta la 1000. El posterior análisis filogenético se realizó usando también el programa MEGA. La matriz de distancias entre cepas se calculó usando el algoritmo de Jukes y Cantor (Jukes y Cantor, 1969) la cual se usó para construir un árbol filogenético mediante el método de *Neighbor-Joining* descrito por Saitou y Nei (Saitou y Nei, 1987). Finalmente, para todos los árboles se obtuvieron los valores de *bootstrap* (método no paramétrico de remuestreo) implementando 1.000 pseudo-réplicas.

Además del árbol filogenético, las secuencias 16S ADN_r se utilizaron para realizar una identificación filogenética de la especie más cercana, proceso que se llevó a cabo inicialmente mediante el análisis de BLAST (Altschul *et al.*, 1990 y 1997) y megaBLAST (Zhang *et al.*, 2000; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), frente a la base de datos de cepas tipo con nombres procarióticos válidamente publicados (Chun *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2012). Después, se seleccionaron las 50 secuencias con valores más altos para el cálculo de la similitud de secuencia por parejas (*pairwise*) usando un algoritmo de alineamiento global que fue implementado por el servidor de EzTaxon server (<http://www.eztaxon.org/>; Chun *et al.*, 2007; <http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>; Kim *et al.*, 2012).

Tabla 11: Cepas tipo cuyas secuencias, obtenidas de GenBank, se han utilizado en este trabajo para el análisis filogenético.

Familia	Especie	Cepa	Nº de acceso
<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Actinoplanes cyaneus</i>	DSM 46137 ^T	X93186
	<i>Actinoplanes deccanensis</i>	IFO 13994 ^T	AB036998
	<i>Actinoplanes digitatis</i>	IFO 12512 ^T	AB037000
	<i>Micromonospora aurantiaca</i>	ATCC 27029 ^T	X92604
	<i>Micromonospora chalcea</i>	DSM 43026 ^T	X92594
	<i>Micromonospora chokoriensis</i>	2-19/6 ^T	AB241454
	<i>Micromonospora humi</i>	P0402 ^T	GU459068
	<i>Micromonospora lupini</i>	lupac 14N ^T	AJ783996
	<i>Micromonospora peucetia</i>	DSM 43363 ^T	X92603
	<i>Micromonospora saelicesensis</i>	Lupac 09 ^T	AJ783993
	<i>Micromonospora tulbaghiae</i>	TVU1 ^T	EU196562
<i>Nocardiaceae</i>	<i>Gordonia sputi</i>	DSM 43896 ^T	X80634
	<i>Nocardia iowensis</i>	UI 122540 ^T	DQ925490
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Actinomycetospora chlora</i>	TT07I-57 ^T	AB514519
	<i>Actinomycetospora lutea</i>	TT00-04 ^T	AB514515
	<i>Amycolatopsis kentuckyensis</i>	NRRL B-24129 ^T	AY183357
	<i>Amycolatopsis lexingtonensis</i>	NRRL B-24131 ^T	AY183358
	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i>	NRRL B-24133 ^T	AY183356
	<i>Amycolatopsis saalfeldensis</i>	HKI0457 ^T	DQ792500
	<i>Amycolatopsis thermalba</i>	SF45 ^T	HQ668525

Familia	Especie	Cepa	Nº de acceso
	<i>Pseudonocardia acaciae</i>	GMKU095 ^T	EU921261
	<i>Pseudonocardia alaniniphila</i>	YIM 16303 ^T	EU722519
	<i>Pseudonocardia alni</i>	DSM 44104 ^T	Y08535
	<i>Pseudosporangium ferrugineum</i>	3-44-a-19 ^T	AB302183
	<i>Saccharothrix texasensis</i>	NRRL B-16107 ^T	AF114815
	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	ATCC 23877 ^T	M27245
	<i>Streptomyces arenae</i>	NBRC 13016 ^T	AB249977
	<i>Streptomyces atrovirens</i>	NRRL B-16357 ^T	DQ026672
	<i>Streptomyces axinellae</i>	Pol001 ^T	EU683612
	<i>Streptomyces bambergiensis</i>	NBRC 13479 ^T	AB184869
	<i>Streptomyces caelestis</i>	NRRL 2418 ^T	X80824
	<i>Streptomyces caeruleus</i>	NRRL 2466 ^T	DQ442532
	<i>Streptomyces caniferus</i>	NBRC 15389 ^T	AB184640
	<i>Streptomyces carpinensis</i>	NBRC 14214 ^T	AB184574
	<i>Streptomyces chartreusis</i>	NBRC 12753 ^T	AB184839
	<i>Streptomyces cirratus</i>	NRRL B-3250 ^T	AY999794
	<i>Streptomyces coelicoflavus</i>	NBRC 15399 ^T	AB184650
	<i>Streptomyces coeruleorubidus</i>	NBRC 12844 ^T	AB184849
	<i>Streptomyces cremeus</i>	NBRC 12760 ^T	AB184124
	<i>Streptomyces drozdowiczii</i>	NBRC 101007 ^T	AB249957
	<i>Streptomyces flavovirens</i>	NBRC 3716 ^T	AB184834
	<i>Streptomyces fumanus</i>	NBRC 13042 ^T	AB184273
	<i>Streptomyces galbus</i>	DSM 40089 ^T	X79852
	<i>Streptomyces gelaticus</i>	NRRL B-2928 ^T	DQ026636
Streptomycetaceae	<i>Streptomyces glauciniger</i>	NBRC 100913 ^T	AB249964
	<i>Streptomyces globisporus</i> subsp. <i>globisporus</i>	NRRL B-2293 ^T	DQ026634
	<i>Streptomyces glomeroaurantiacus</i>	NBRC 15418 ^T	AB249983
	<i>Streptomyces gramineus</i>	JR-43 ^T	HM748598
	<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i>	NBRC 15440 ^T	AB184676
	<i>Streptomyces griseoplanus</i>	AS 4.1868 ^T	AY999894
	<i>Streptomyces halstedii</i>	NBRC 12783 ^T	AB184142
	<i>Streptomyces libani</i> subsp. <i>rufus</i>	LMG 20087 ^T	AJ781351
	<i>Streptomyces lienomycini</i>	LMG 20091 ^T	AJ781353
	<i>Streptomyces longwoodensis</i>	LMG 20096 ^T	AJ781356
	<i>Streptomyces lydicus</i>	NBRC 13058 ^T	AB184281
	<i>Streptomyces misionensis</i>	NBRC 13063 ^T	AB184285
	<i>Streptomyces murinus</i>	NBRC 12799 ^T	AB184155
	<i>Streptomyces mutomycini</i>	NBRC 100999 ^T	AB249951
	<i>Streptomyces neopectinius</i>	KNF 2047 ^T	EU258679
	<i>Streptomyces netropsis</i>	NBRC 3723 ^T	AB184792
	<i>Streptomyces niveoruber</i>	NBRC 15428 ^T	AB184675
	<i>Streptomyces nogalater</i>	JCM 4799 ^T	AB045886
	<i>Streptomyces novaecaesareae</i>	NBRC 13368 ^T	AB184357

Familia	Especie	Cepa	Nº de acceso
	<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	NBRC 3178 ^T	AB184737
	<i>Streptomyces pactum</i>	NBRC 13433 ^T	AB184398
	<i>Streptomyces phaeoluteichromatogenes</i>	NRRL B-5799 ^T	AJ391814
	<i>Streptomyces pulveraceus</i>	LMG 20322 ^T	AJ781377
	<i>Streptomyces purpurascens</i>	NBRC 13077 ^T	AB184859
	<i>Streptomyces recifensis</i>	NBRC 12813 ^T	AB184165
	<i>Streptomyces seoulensis</i>	NBRC 16668 ^T	AB249970
	<i>Streptomyces silaceus</i>	NRRL B-24166 ^T	EU812170
	<i>Streptomyces sporoclivatus</i>	NBRC 100767 ^T	AB249934
	<i>Streptomyces tendae</i>	ATCC 19812 ^T	D63873
	<i>Streptomyces thinghirensis</i>	DSM 41919 ^T	FM202482
	<i>Streptomyces vinaceus</i>	NBRC 13425 ^T	AB184394
	<i>Streptomyces violaceolatus</i>	DSM 40438 ^T	AF503497
	<i>Streptomyces violascens</i>	NBRC 12920 ^T	AB184246
	<i>Streptomyces virginiae</i>	NBRC 12827 ^T	AB184175
	<i>Streptomyces xanthochromogenes</i>	NRRL B-5410 ^T	DQ442559
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Streptosporangium longisporum</i>	DSM 43180 ^T	X89944
<i>Thermomonosporaceae</i>	<i>Actinomadura fulvescens</i>	IFO 14347 ^T	U49005
	<i>Actinomadura madurae</i>	DSM 43067 ^T	X97889

3.6. Técnicas para el análisis de metabolitos secundarios.

3.6.1. Actividades antimicrobianas producidas por tacos de agar de los cultivos.

Con el fin de detectar en una primera aproximación y de una forma rápida y sencilla la posible producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, decidimos utilizar tacos de agar de los cultivos empleados en este estudio en ensayos de difusión en agar frente a la bacteria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (MB5393), la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* (MB4926) y contra la levadura *Candida tropicalis* (MY1012), todas ellas procedentes de la colección de cultivos de Merck & Co., Inc. (Basilio *et al.*, 2003). Las bacterias usadas para estos ensayos eran resistentes, al menos, a un agente antimicrobiano: *S. aureus* era resistente a la meticilina; *E. coli* era resistente a penicilina, cefalosporinas y macrólidos. *Candida tropicalis* era resistente a fluconazol e itraconazol (Cartledge *et al.*, 1997). Los inóculos y las placas de ensayo para las cepas bacterianas y la levadura se prepararon según se ha descrito con anterioridad (Pelaez *et al.*, 1998; Suay *et al.*, 2000). Los tacos de agar de 9mm de diámetro de cada una de las cepas actinomicetos crecidos en YME agar se colocaron sobre la superficie de las placas de ensayo sembradas respectivamente con cada uno de los microorganismos diana. Los halos de inhibición se midieron después de 24 h de incubación a 30°C en el caso de la levadura o a 37°C en el caso de las bacterias.

3.6.1.1. Preparación de los inóculos y de las placas de ensayo.

Los protocolos para la preparación de las placas de ensayo y las condiciones para la siembra y crecimiento de los inóculos de cada microorganismo de ensayo son los descritos detalladamente por Pelaez y colaboradores (1998); Suay y colaboradores (2000) y Basilio y colaboradores (2003), aunque a continuación vamos a describir brevemente su preparación:

***Staphylococcus aureus* (MB 5393)** (cepa resistente a meticilina-MRSA)

INÓCULO

- 600-750 µl del stock del cultivo congelado
- 50 ml de *BHI* (*Brain Heart Infussion broth*) (237500 BECTON DICKINSON) (37 gr/l)
- Incubar a 37°C durante 24 h a 220 rpm.

PLACAS DE ENSAYO

- *BHI*: 37 g/l
- Bacto-agar: 15 g/l
- Leer la D.O. del cultivo crecido durante la noche con *BHI* como blanco.
- Inocular a 48°C al 3,3 % del inóculo ajustado a una D.O. de 0,22 a 660 nm.

***Escherichia coli* (MB 4926)**

INÓCULO

- 250-300 µl del stock del cultivo congelado
- 50 ml de *BHI* (37 g/l)
- Incubar a 37°C durante 24 h a 220 rpm.

PLACAS DE ENSAYO

- *BHI*: 37 g/l
- Bacto-agar: 15 g/l
- Inocular a 48°C con 3% de inóculo ajustado a una D.O. de 0,22 a 660 nm.

***Candida tropicalis* (MY 1012)**

MEDIO DE INÓCULO

- 1ml del stock del cultivo congelado
- 15 ml de SBD (*Saboraud Dextrose Broth*) (238230 BECTON DICKINSON). (30 g/l)
- Incubar a 37°C durante 48 h a 220 rpm.

PLACAS DE ENSAYO

Con MES*:

15 g/l de Bacto-agar.

800 ml de agua.

AUTOCLAVAR

100 ml de MES *

100 ml de completo**

Medir la D.O. del cultivo crecido durante la noche con *Potato Dextrose*.
Inocular un 2% del inóculo, ajustado a una D.O. de 0,6 a 660nm.

***MES:** - NaOH: 30 g/l (disolverlo en primer lugar).
- MES: 213,2 g/l
Ajustar a pH 7,0 (para 700ml aprox. se añaden 12 ml de NaOH – 34%).
- Añadir 1000 ml de agua.

****COMPLETO:** - *Yeast Nitrogen Base* (YNB): 67,5 g/l
- Dextrosa: 10 g/l

* Esterilizar por filtración - NO AUTOCLAVAR. Guardarlos a 4°C.

PLACAS DE ENSAYO

En cada placa se distribuyen 100 ml inoculados con la cepa de ensayo
Se dejan secar abiertas durante 5 minutos.
Se dejan secar cerradas durante 10 minutos.
Guardar a 4°C.

3.6.1.2. Realización del ensayo.

Los tacos de agar se realizaron con el extremo mayor de una punta de pipeta de 5 ml estéril que produjo un taco de unos 9-10 mm de diámetro, a partir de las placas de YME de los cultivos y se colocaron sobre la placa de ensayo con la ayuda de unas pinzas metálicas estériles. Las placas de ensayo son placas NUNC de 245 mm x 245 mm que contenían 100 ml del medio apropiado para cada microorganismo de ensayo que había sido inoculado respectivamente con cada uno de los tres microorganismos de ensayo. Las placas con los tacos se incubaron durante toda la noche a 37°C y se registró el diámetro del halo de inhibición producido a la mañana siguiente.

Como controles positivos pusimos 10 µl de los antibióticos control sobre la superficie del agar: tricotecina para MY1012 y gentamicina para MB5393 y MB4926.

3.6.2. Actividades antimicrobianas producidas por microfermentaciones en medios sólidos y en medios líquidos.

Con el fin de estudiar con más detalle el potencial metabólico del grupo de cepas de la familia *Pseudonocardiaceae* y ver si cepas que son fenotípica y genotípicamente iguales son capaces de producir distintos metabolitos y distintas actividades antimicrobianas, o si por el contrario producen todas ellas las mismas actividades y metabolitos decidimos analizar las

actividades antimicrobianas producidas así como la detección de metabolitos conocidos mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas (LC/MS).

Por otro lado, queríamos confirmar si los datos de actividad resultantes del ensayo con tacos de agar se reproducían al fermentar las cepas tanto en medios sólidos como en medios líquidos. Además de confirmar las actividades inicialmente detectadas queríamos ver una posible correlación entre las actividades detectadas y la presencia de metabolitos conocidos en los extractos generados.

Para ello, seleccionamos 32 cepas de *Pseudonocardiaceae* que crecimos en cuarenta condiciones de fermentación distintas. Las condiciones de fermentación seleccionadas incluían fermentaciones en medio sólido que trataban de reproducir las condiciones originales de los tacos de agar, así como fermentaciones en medios líquidos.

Las condiciones de fermentación para cada una de las 32 cepas fueron:

- Se seleccionaron diez medios con diferentes fuentes de carbono, de nitrógeno y de sales minerales para ampliar el espectro de elementos nutricionales e incrementar las posibilidades de inducir la producción de metabolitos secundarios, utilizando desde medios muy limitados hasta medios con gran cantidad de nutrientes.

- fermentaciones sólidas y líquidas.
- tiempos de incubación de 7 y 14 días.

La combinación de todas estas condiciones de fermentación, dio lugar a 40 fermentaciones para cada una de las cepas, generando un total de 1280 fermentaciones, la mitad de ellas en medios sólidos y la otra mitad en medios líquidos.

3.6.2.1. Fermentación de cultivos.

3.6.2.1.1. Fermentaciones en medios líquidos.

Para determinar la actividad biológica de los cultivos de la familia *Pseudonocardiaceae*, se prepararon fermentaciones miniaturizadas en placas multipocillo utilizando el “sistema Duetz” (www.enzymscreen.com) (Duetz *et al.*, 2000; Minas *et al.*, 2000; Duetz, 2007).

A partir de las placas Petri (55 mm) con YME de cada uno de los cultivos seleccionados se transfirieron 5 tacos de agar con ayuda de un *transfer tube* a un tubo de colonia que contenía 10 ml de medio líquido ATCC-2 (5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NZamina EKC, 3 g/l de extracto de carne, 5 g/l de peptona, 1 g/l de dextrosa, 2 g/l de almidón de patata y 1 g/l de CaCO₃ (añadido después de medir el pH)) y un cubreobjetos de cristal de 25-mm para homogeneizar el inóculo. De cada uno de estos inóculos, una vez comprobada su esterilidad en placas BH (*Brain-Heart Infusion Agar*), se transfirieron 750 µl a una placa multipocillo *deep-well* de 96-pocillos cuadrados (2ml de capacidad cada pocillo) para hacer la

denominada “placa madre” a partir de la cual inoculamos todas las placas de fermentación con cada uno de los medios líquidos o sólidos (**Figura 4: A-C**).

Los medios previamente autoclavados se dispensaron en placas Duetz (Volumen máx: 2 ml/pocillo) añadiendo 800 μ l/ pocillo. A continuación se inocularon los cultivos a partir de la “placa madre” con un replicador, repitiendo esta operación tres veces para asegurar la transferencia del inóculo al medio líquido (**Figura 4: D-F**). Las placas se incubaron 7 y 14 días a 28°C, 75% de humedad a 300 rpm en un incubador Kühner modelo ISF-4-V (Adolf Kühner AG, Birsfelden, Suiza).

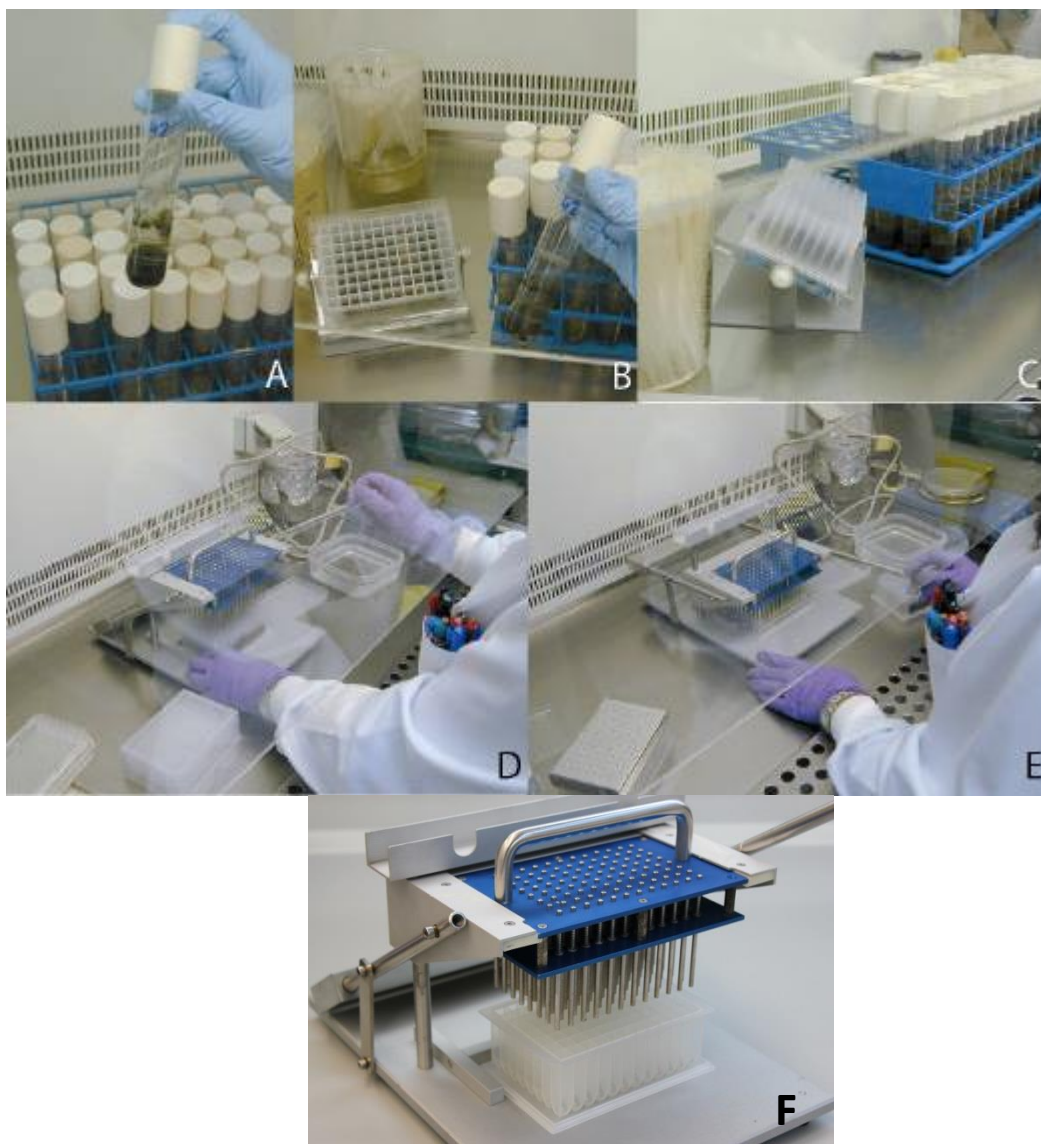
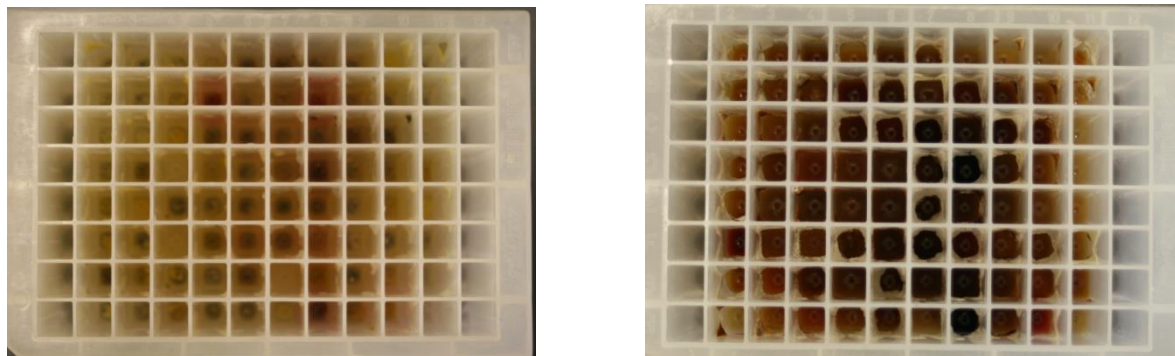


Figura 4: A-F. Preparación e inoculación de las cepas seleccionadas en diferentes medios mediante el “sistema Duetz”. Fig. A. Tubos de inóculo con las cepas crecidas en medio ATCC-2. Figs. B y C. Preparación de la “placa madre” con los inóculos de las cepas. Figs. D y E. Proceso de replicación en las placas multipocillo conteniendo bien medio líquido o medio sólido. Fig. F. Detalle del replicador.

Los medios de fermentación se seleccionaron en base a la experiencia en el laboratorio del *screening* de productos naturales bioactivos de actinomicetos. Además, a uno de los medios usados habitualmente en el laboratorio (DEF-15) le hemos añadido una pequeña cantidad de la tierra rara escandio (DEF15-Sc), ya que se ha descrito que la adición de este oligoelemento no sólo incrementa la producción de la cantidad de antibiótico en algunas cepas de *Streptomyces* sino que en algunas cepas induce la activación de rutas biosintéticas silentes (Kawai *et al.*, 2007).

Figura 5: Placas Duetz después de la fermentación en medios líquidos.



La composición de los diez medios seleccionados fue la siguiente:

DEF-15 (Lam <i>et al.</i> , 1995)	
	g/l
Sacarosa (SIGMA S9378)	40
NH₄Cl (PANREAC 141121)	2
Na₂SO₄ (PANREAC 131716)	2
K₂HPO₄ (MERCK 1.05101.1000)	1
MgCl₂·6H₂O (MERCK 906 A376433)	1
NaCl (MERCK 1.06404.1000)	1
CaCO₃ (añadir después de ajustar el pH) (MERCK 8605747)	2
Agua desionizada	hasta 1 litro
Elementos traza	1 ml
pH 7,0	

Solución de elementos traza: en 100 ml

MnCl ₂ ·4H ₂ O	100 mg
ZnCl ₂	100 mg
FeCl ₂ ·4H ₂ O	100 mg
NaI	50 mg

DEF-15S	
	g/l
Sacarosa (SIGMA S9378)	5
Almidón soluble de patata (PANREAC 121096)	20
NH₄Cl (PANREAC 141121)	2
Na₂SO₄ (PANREAC 131716)	2
K₂HPO₄ (MERCK 1.05101.1000)	1
MgCl₂ · 6H₂O (MERCK 906 A376433)	1
NaCl (MERCK 1.06404.1000)	1
CaCO₃ (añadir después de ajustar el pH) (MERCK 8605747)	2
Agua desionizada	hasta 1 litro
Elementos traza	1 ml
pH 7,0	

Solución de elementos traza: en 100 ml

MnCl ₂ ·4H ₂ O	100 mg
ZnCl ₂	100 mg
FeCl ₂ ·4H ₂ O	100 mg
NaI	50 mg

DEF15-Sc (ScCl ₃ 10µM) (<i>Kawai et al., 2007</i>).	
	g/l
Sacarosa (SIGMA S9378)	40
NH₄Cl (PANREAC 141121)	2
Na₂SO₄ (PANREAC 131716)	2
K₂HPO₄ (MERCK 1.05101.1000)	1
MgCl₂ · 6H₂O (MERCK 906 A376433)	1
NaCl (MERCK 1.06404.1000)	1
CaCO₃ (añadir después de ajustar el pH) (MERCK 8605747)	2
ScCl₃ 5 Mm (SIGMA 409359)	2 ml
Agua desionizada	hasta 1 litro
Elementos traza	1 ml
pH 7,0	

Solución de elementos traza: en 100 ml

MnCl ₂ ·4H ₂ O	100 mg
ZnCl ₂	100 mg
FeCl ₂ ·4H ₂ O	100 mg
NaI	50 mg

DNPM	
	g/l
Dextrina de maíz Tipo I (SIGMA D2006)	40
N-Z Soy BL (SIGMA P6713)	7.5
Primary yeast	5
MOPS (CALBIOCHEM 475898)	21
Agua desionizada	hasta 1 litro
pH 7,0	

FPY-12	
	g/l
Fructosa (PANREAC 142728)	20
Glucosa (PANREAC 131341)	10
Maltosa (MERCK 1.05910.0500)	10
Bacto Peptona (DIFCO 211677)	5
Amicasa (SIGMA A2427)	5
Agua desionizada	hasta 1 litro
Elementos traza	1ml
pH 7,0	

Solución de elementos traza:

FeSO ₄ ·7H ₂ O	500 mg/l
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	500 mg/l
MnSO ₄ ·H ₂ O	100 mg/l
CuSO ₄ ·5H ₂ O	50 mg/l
CoCl ₂ ·6H ₂ O	50 mg/l

FR23	
	g/l
Glucosa (PANREAC 131341)	5
Almidón soluble de patata (PANREAC 121096)	30
Melaza de caña	20
Pharmamedia-Cottonsee flour (Traders Protein)	20
Agua desionizada	hasta 1 litro
pH 7,0	

FRM	
	g/l
Glicerol (PANREAC 141339)	20
Dextrina de maíz Tipo I (SIGMA D2006)	20
Bacto soytone (DIFCO 243620)	10
Bacto extracto de levadura (DIFCO 212750)	3
(NH₄)₂SO₄ (PANREAC 141140)	2
CaCO₃ (añadir después de ajustar el pH) (MERCK 8605747)	3
Agua desionizada pH 7,4	hasta 1 litro

GOT	
	g/l
Glicerol (PANREAC 141339)	60
Harina de avena	15
Pasta de tomate	5
CaCO₃ (añadir después de ajustar el pH) (MERCK 8605747)	3
Agua desionizada pH 7,0	hasta 1 litro

KHC	
	g/l
Dextrina de maíz Tipo I (SIGMA D2006)	20
Beta ciclo dextrina (SIGMA C4767)	10
Pasta de tomate	20
Primary yeast	10
CoCl₂·6H₂O (SIGMA C8661)	5 mg
Agua desionizada pH 7,2	hasta 1 litro

YME	
	g/l
Extracto de levadura (BECTON DICKINSON 212750)	4
Extracto de malta (BECTON DICKINSON 218630)	10
Glucosa (Panreac 131341.1211)	4
Agua desionizada pH 7,0	hasta 1 litro

3.6.2.1.2. Fermentaciones en medios sólidos.

Las placas multipocillo para las fermentaciones con medios sólidos (**Figura 6**) fueron placas estériles *MultiScreen* de Millipore (MultiScreen-GV, MAGV S2210, con filtro de 0,22 μm) que tienen una membrana en la parte inferior de la placa y una superficie de plástico en el fondo que se perfora al centrifugar la placa.

Los medios sólidos utilizados fueron los mismos que los líquidos pero se les añadieron 15 g/l de agarosa (Sigma Type III-A, A-9793). Las placas *MultiScreen* se llenaron con 275 μl de cada uno de los medios con agarosa usando un *Multidrop* (ThermoLabSystems).

Las placas se inocularon como en el caso de las fermentaciones líquidas mediante el “sistema Duetz” utilizando el replicador como anteriormente y a partir de la misma “placa madre”. Una vez inoculadas las placas se guardaron en una bolsa de plástico con cierre para evitar que se secaran y se incubaron a 28°C durante 7 y 14 días.

Figura 6: Placas multipocillo después de la fermentación en medio sólido.



3.6.2.2. Extracción de las fermentaciones.

3.6.2.2.1. De medios líquidos.

La preparación de los extractos de los caldos de fermentación se realizó añadiendo 800 µl de acetona y 40 µl de DMSO al 20% a los 800 µl/pocillo de los caldos en la placa de fermentación. A continuación se agitaron en un incubador con agitación orbital Kühner a 200 rpm, 1 hora, centrifugando a continuación (Centrífuga Rotanta 460 RS, Hettich Zentrifugen) para eliminar los restos celulares. Para evaporar la acetona del extracto, las placas se centrifugaron en vacío durante 12 horas en GeneVac 4T-24 y los caldos se concentraron 4x (200 µl finales). En una estación de pipeteo automatizada (Biomek Fx) se prepararon placas de ensayo ABgene añadiendo por pocillo una alícuota de 160 µl de cada extracto para su posterior evaluación de la actividad antimicrobiana.

3.6.2.2.2. De medios sólidos.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se centrifugan las placas *MultiScreen* en una centrífuga Rotanta 460 RS, (Hettich Zentrifugen) o Beckman Allegra 6R a 3200 rpm durante 20 minutos para recoger en una placa Whatman Polyfiltronics (96-pocillos, 750µl, fondo redondo, 7701-5750) unos 150-200µl de extracto acuoso. La forma de acoplar la placa *MultiScreen* a la placa Whatman para realizar la centrifugación se llevó a cabo según las recomendaciones de Millipore. A este extracto acuoso se le añade un volumen igual de acetona.

3.6.2.3. Detección de actividades antimicrobianas de los extractos de la fermentación.

Las pruebas para detectar las actividades antibacterianas se realizaron con la cepa de *Staphylococcus aureus* MSSA (sensible a meticilina) (Novick, 1991), la cepa de *Acinetobacter baumannii* (resistente a imipenem), la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* PAO-1 (Holloway et al., 1979) y la cepa de *Candida albicans* MY1055 (Pfaller y Barry, 1994; Yamaguchi et al., 2002).

Acinetobacter baumannii MB5973.

A partir de los crioviales con la suspensión del inóculo stock congelado se sembró una estría en placas de medio Luria-Bertani con agar (LBA, 40 g/l) y se incubó a 37°C durante toda la noche para obtener colonias aisladas. Las colonias aisladas se seleccionaron para inocular un caldo incubado por la noche que se usó como inóculo para los ensayos en placa. Las colonias aisladas se inocularon en 10 ml de medio Luria-Bertani líquido (LB, 25 g/l) en matraces Erlenmeyer de 250ml. Los matraces se incubaron durante la noche a 37°C a 220 rpm. La suspensión del cultivo se ajustó a 0,35 (D.O._{612nm}) con medio LB y a continuación se hizo una dilución 1:10.000 para obtener los inóculos del ensayo con aproximadamente 5-6 x 10⁹ CFU/ml. Para el ensayo, 90 µl del inóculo diluido se mezclaron con 10 µl del extracto de fermentación, así como con ciprofloxacina y anfotericina B que se utilizaron como controles

internos del ensayo. La dispensación de las muestras se realizó con una estación robotizada de pipeteo Tecan-Aquarius (Tecan, Durham, USA) en placas 96-well microtiter Costar 3370 (Corning, NY, USA). La absorbancia a D.O. $_{612nm}$ se midió con un espectrofotómetro Tecan UltraEvolution (Tecan, Durham, USA) a tiempo cero (T_0), e inmediatamente después las placas se incubaron de forma estática a 37°C durante 18-20 horas. Después de la incubación, las placas se agitaron usando un agitador DPC Micromix-5 y luego se volvió a medir la absorbancia a D.O. $_{612nm}$ a tiempo final (T_f). El porcentaje de inhibición del crecimiento se calculó según la siguiente normalización:

$$\% \text{ Inhibición: } \frac{(1 - (T_{f\text{muestra}} - T_{0\text{muestra}}) - (T_{f\text{Blanco}} - T_{0\text{Blanco}}))}{(T_{f\text{Crecimiento}} - T_{0\text{Crecimiento}}) - (T_{f\text{Blanco}} - T_{0\text{Blanco}}))} \times 100.$$

Un extracto se consideró activo cuando el porcentaje de inhibición era superior al 50%.

Staphylococcus aureus EPI167.

Los stocks congelados se utilizaron para inocular placas de LB agar que contenían 15 µg/ml de cloranfenicol para obtener un crecimiento confluyente. Las placas se incubaron durante 18-20 horas a 37°C. Las colonias obtenidas se recogieron de las placas de LB y se inocularon en un matraz de 250 ml con 10 ml de medio LB. Se incubaron toda la noche (18-20 horas) a 37°C, 220 rpm. Al día siguiente se midió la D.O. a 600 nm de absorbancia y se ajustó a 0,3. Este inóculo se utilizó para hacer una segunda dilución 1:100 (que contenía 34 mg/ml de cloranfenicol) cuya concentración final era aproximadamente de 6×10^5 CFU/ml.

El ensayo se realizó como se ha descrito antes para *A. baumannii*. Como controles negativos y positivos se utilizaron anfotericina B y penicilina G en cada placa de ensayo. Un extracto se consideró activo cuando el porcentaje de inhibición era superior al 50%.

Pseudomonas aeruginosa PAO5919.

A partir de los crioviales con la suspensión del inóculo stock congelado se sembró una estría en placas de medio LB con agar (LBA, 40 g/l) y se incubó a 37°C durante toda la noche para obtener colonias aisladas. Las colonias aisladas se seleccionaron para inocular un caldo incubado por la noche que se usó como inóculo para los ensayos en placa. Las colonias aisladas se inocularon en 10ml de medio Luria-Bertani líquido (LB, 25 g/l) en matraces Erlenmeyer de 250 ml. Los matraces se incubaron durante la noche a 37°C a 220 rpm. El cultivo de la noche se ajustó para obtener el inóculo del ensayo con aproximadamente 5×10^5 CFU/ml. Como referencia la D.O. $_{600nm}$ de una dilución 1:20 del cultivo de la noche es 0,35.

El ensayo se realizó como se ha descrito antes para *A. baumannii*. Ciprofloxacina y anfotericina B se utilizaron como controles internos en cada placa de ensayo. Un extracto se consideró activo cuando el porcentaje de inhibición era superior al 50%.

Candida albicans MY1055.

A partir de los crioviales con la suspensión del inóculo stock congelado se sembró una estría en placas con medio *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA, 65g/l) para tener un crecimiento confluyente. Las placas se incubaron durante 18 horas a 37°C. Las colonias crecidas se recogieron de las placas de SDA y se resuspendieron en el medio RPMI-1640 modificado con el fin de preparar un inóculo ajustado a 0,25 a una D.O. a 660nm.

El medio RPMI-1640 modificado se prepara de la siguiente forma:

20,8 g de RPMI (Sigma) se añadieron a un matraz de 2 l, junto con 13,4 g de YNB, 1,8 l de agua milliQ, 80 ml de Hepes 1 M y 72 ml de glucosa 50 %. El volumen se ajustó a 2 l y se filtró.

La suspensión ajustada se diluyó 1:10 y mantuvo en hielo hasta que se usó para inocular las placas *96-well microtiter*. El ensayo se realizó como se ha descrito antes para *A. baumannii*. Anfotericina B y penicilina G se utilizó como control positivo y negativo, respectivamente, en cada placa de ensayo. Un extracto se consideró activo cuando el porcentaje de inhibición era superior al 50%.

3.6.2.4. Análisis de los metabolitos mediante LC-MS.

3.6.2.4.1. Método *Gold*.

Los extractos microbianos de los extractos activos se someten a un análisis de LC-MS y los perfiles de masas obtenidos se comparan con los perfiles de metabolitos secundarios que se guardan en una base de datos para identificar antibióticos conocidos. Esta base de datos, contiene los datos de LC-MS de más de 800 familias de productos naturales con actividad antimicrobiana.

El método empleado, denominado *Gold*, examina por LC-MS un volumen de 2 µl de los extractos activos seleccionados y los perfiles obtenidos se comparan con una base de datos interna para encontrar coincidencias con antibióticos u otros metabolitos conocidos. Dicho análisis se llevó a cabo en un LC-MS Cuadrupolo (Agilent 1100), usando una columna Zorbax SB-C8 (2,1 x 30 mm) mantenida a una temperatura constante de 40°C y con un caudal de 300 µl/min. El solvente A estaba compuesto por un 10% de acetonitrilo y un 90% de agua con 1,3 mM de ácido trifluoroacético y formato amónico, y el solvente B estaba formado por un 90% de acetonitrilo y un 10% de agua con ácido trifluoroacético y formato amónico. El gradiente empezó con 10% del solvente B y llegó al 100% de este mismo solvente B en 6 minutos; 100% del solvente B permaneció durante 2 minutos y volvió al 10% de B en los 2 minutos siguientes hasta inicializar el sistema. Se registraron los espectros escaneados UV de 100 a 900 nm en pasos de 0,25 seg/escan utilizando diodos en matriz. La ionización del disolvente de elución se obtuvo usando una fuente de electro spray ESI de Agilent 1100 ajustado a un flujo de gas seco de 11 l/min a 325 °C y a una presión del nebulizador de 40 psig. El voltaje del capilar se estableció a 3500 V. Los espectros de masas se recogieron en

escaneado completo desde 150 m/z a 1500 m/z, con un escaneado cada 0,77 segundos y en ambos modos: ión positivo y negativo. La comparación de datos se hizo usando una aplicación informática interna donde los valores de DAD, tiempo de retención, y los espectros de masas POS y NEG de las muestras activas se contrastaron con los de UV-LC-MS de metabolitos conocidos almacenados en dicha base de datos interna. Los nuevos extractos se analizaron en las mismas condiciones de LC-MS que se usaron para obtener los datos de los metabolitos que sirven de referencia y que están incluidos en la base de datos.

3.7. Análisis de *clusters*.

3.7.1. Análisis de clusters según la composición de ácidos grasos de los cultivos.

Los perfiles de los ácidos grasos de cada cultivo se compararon usando el programa informático Bionumerics, versión 5.1 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica) aplicando distancias Euclidianas para calcular la matriz de distancias y construyendo un dendrograma con el algoritmo UPGMA para visualizar la relación entre las cepas (Vauterin *et al.*, 1996).

3.7.2. Análisis de clusters según los patrones de amplificación o de digestión (PCR-fingerprinting).

El análisis numérico de los perfiles de amplificación obtenidos con cada técnica se realizó con el programa informático Bionumerics, versión 5.10 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Bélgica) tal y como se ha descrito con anterioridad (Louws *et al.*, 1995; Rademaker y De Bruijn, 1997; Versalovic *et al.*, 1998a; Vaneechoutte *et al.*, 1999). Para cada una de las técnicas utilizadas se calculó la similitud entre los patrones de bandas en base a las curvas densitométricas (a partir de los valores comprendidos entre 0 y 255 dentro de la escala de grises) de cada una de las carreras (400 puntos de datos/curva densitométrica) mediante el coeficiente de similitud de Pearson o coeficiente de correlación del momento-producto o valor *r* (Pearson, 1926), aplicado a la totalidad de las curvas densitométricas de los carriles del gel (Hane *et al.*, 1993; Rademaker y De Bruijn, 1997). El análisis de clusters de los valores de similitud obtenidos a pares se llevó a cabo usando el algoritmo de UPGMA.

Además, en el caso de los patrones de digestión de los productos de amplificación de las rutas biosintéticas detectadas se calculó por un lado, la similitud entre parejas de los patrones de digestión por separado y a continuación, con la finalidad de incrementar el poder de resolución, se obtuvieron también matrices de distancias basadas en la concatenación de los patrones electroforéticos obtenidos mediante la combinación lineal de los tres perfiles de digestión en lo que se conoce como “gel combinado” en el programa Bionumerics, versión 5.10.

3.8. Análisis estadísticos para la comparación de técnicas y de la diversidad de la población estudiada.

3.8.1. Comparación de técnicas.

Para conocer el grado de congruencia o solapamiento entre las distintas técnicas de caracterización de los microorganismos utilizadas, así como para saber qué información se obtiene de cada técnica y el poder de discriminación o la profundidad taxonómica de cada una de ellas, hemos comparado las respectivas matrices de similitud obtenidas. Una forma de visualizar el grado de concordancia entre dos técnicas es representar en un eje de coordenadas X-Y los correspondientes valores de similitud de ambas técnicas. BioNumerics permite realizar este tipo de comparaciones entre varias técnicas a la vez cuyo resultado es una matriz con los valores de la congruencia existente entre cada una de las técnicas y un dendrograma resultante de dicha matriz que facilita la visualización e interpretación de la comparación. El método utilizado por defecto para calcular la congruencia entre dos experimentos es mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

3.8.2. Estimación de la diversidad de las cepas aisladas.

Con el fin de poder estimar y comparar la riqueza de especies presentes en una población, así como poder comparar los métodos de caracterización de cepas, se han desarrollado numerosas aproximaciones estadísticas. Una forma sencilla de medir o estimar la diversidad de un conjunto de cepas como resultado de la aplicación de un método de caracterización determinado es calculando la riqueza (**S**) que es el número total de OTUs en una población. También podemos calcular la cantidad media esperada para cada categoría (N_e) que es el número total de cepas dividido por el número de categorías, $N_e = N/n$ siendo N el número total de cepas y n el número de categorías.

Otro de los métodos para calcular o estimar la diversidad de las cepas en una población es el índice de diversidad de Simpson, (Simpson, 1949). Este índice de discriminación ha sido empleado por Hunter y Gaston (Hunter y Gaston, 1988) y por otros autores para comparar el poder de discriminación de diferentes métodos de caracterización.

El índice de Simpson (**D**) es la probabilidad de que dos cepas elegidas al azar sean de la misma OTU y se calcula mediante la fórmula:

$$D = 1 - P$$

siendo $P = \sum n(n-1) / N(N-1)$

donde N es el total de organismos presentes y n es el número de ejemplares por especie.

Otro de los índices más ampliamente utilizado es el índice de diversidad de Shannon (**H'**) o de Shannon-Weiner que tiene en cuenta dos aspectos de la diversidad, la riqueza de

las especies y la uniformidad de la distribución del número de individuos de cada especie. Este índice H' tiene un valor de 0 si solo hay una especie, y alcanza su valor máximo si todas las especies del conjunto están representadas por un número igual de individuos ([Zak y Willig, 2004](#)). En la mayoría de los ecosistemas naturales H' varía entre 1 y 5. El índice está basado en la abundancia relativa de cada taxón identificado y su fórmula es:

$$H' = -\sum (n/M) \ln(n/M)$$

donde n es el número de cepas en una OTU y N es el número total de cepas.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Aislamiento de actinomicetos a partir de muestras de líquenes.

En el presente estudio nos hemos planteado el aislamiento de cepas de actinomicetos utilizando los líquenes como una fuente alternativa para la obtención de los mismos. Para ello, recibimos en el laboratorio 26 líquenes sin identificar taxonómicamente procedentes de tres zonas geográficas que incluían desde regiones frías subpolares de Alaska, a regiones tropicales de Hawai o de la isla de Reunión. Así, teníamos líquenes adaptados a climas fríos (Alaska), otros a zonas tropicales pero procedentes de entornos volcánicos semiáridos y creciendo en nichos distintos, bien sobre rocas expuestas a elevadas dosis de radiación solar o sobre árboles (Hawai) y otros procedentes de bosques tropicales frondosos con un elevado grado de humedad (Reunión).

Los líquenes presentaban una elevada variedad debido a la diversidad geográfica y a las características climáticas, medioambientales y de nichos ecológicos. Estos líquenes se utilizaron para el aislamiento de actinomicetos, pudiéndose aislar y seleccionarse para este trabajo, según criterios de diversidad morfológica macro y microscópica, un total de 404 cepas. En la **Tabla 12** se describe el origen de los líquenes utilizados para el aislamiento de actinomicetos así como el número de cultivos que se aislaron de cada uno de los especímenes. El número de cultivos morfológicamente distintos que se seleccionó a partir de cada muestra variaba entre 1 y 54. El reducido número de cepas (26 cultivos) aisladas de los 7 líquenes de Alaska contrasta con los 378 cultivos seleccionados de los 19 líquenes tropicales, incluyendo 172 cepas de los 10 líquenes de Hawai y 206 cepas de los 9 líquenes procedentes de la isla de Reunión (**Tabla 12**). También observamos que se seleccionaron mayor número de cepas de los líquenes arbóreos de Hawai (55% de las cepas de Hawai) que de los provenientes de rocas (45% de las cepas de Hawai). Además, tanto el número total de cepas aisladas de líquenes de árboles de zonas húmedas de Reunión como el número medio de cepas por líquen (22,9 cepas/liquen) es mayor que los obtenidos de los líquenes arbóreos de Hawai procedentes de zonas áridas volcánicas (18,8 cepas/liquen).

Tabla 12: Líquenes utilizados para el aislamiento de actinomicetos según su origen geográfico, tipo de sustrato y número de cultivos seleccionados de cada uno de ellos.

Origen	Liquen	Lugar	Hábitat	Nº cepas aisladas	%
ALASKA	A-1	Kain's, 2 millas al norte de Sitka	Roca	1	
	A-2	Kain's, 2 millas al norte de Sitka	Roca	2	
	A-3	Río Chiniak, bahía de Chiniak,Kodiak	Roca	4	
	A-4	Río Chiniak, bahía de Chiniak,Kodiak	Roca	7	
	A-5	Lago La Rose Tead,Kodiak	Roca	1	
	A-6	Lago La Rose Tead,Kodiak	Roca	2	
	A-7	Río Americano,Kodiak	Roca	9	
	Total			26	6,4
HAWAI	H-1	Carretera a Waimea. isla de Hawai	Árbol	54	
	H-2	Carretera a Hilo, isla de Hawai	Árbol	2	
	H-3	Carretera a Hilo, isla de Hawai	Árbol	10	
	H-6	Parque Estatal Mauna Kea, isla de Hawai	Árbol	22	
	H-9	Kilauea, isla de Hawai	Árbol	6	
			Árbol	94	23,3
	H-4	Carretera a Hilo, isla de Hawai	Roca	29	
	H-5	Parque Estatal Mauna Kea, isla de Hawai	Roca	13	
	H-7	Carretera a Hilo, isla de Hawai	Roca	4	
	H-8	Parque Estatal Mauna Kea, isla de Hawai	Roca	25	
	H-10	Desierto Kau, isla de Hawai	Roca	7	
			Roca	78	19,3
	Total			172	42,6
REUNIÓN	R-1	Embalse de Takamakai	Árbol	3	
	R-2	Catarata Bras rouge, valle de Cilaos	Árbol	4	
	R-3	Catarata Bras rouge, valle de Cilaos	Árbol	33	
	R-4	Catarata Bras rouge, valle de Cilaos	Árbol	54	
	R-5	Catarata Bras rouge, valle de Cilaos	Árbol	39	
	R-6	Catarata Bras rouge, valle de Cilaos	Árbol	37	
	R-7	Lava de 1976	Árbol	27	
	R-8	Sendero hacia Cap Noir, valle de Dos d'ane	Árbol	6	
	R-9	Sendero hacia Cap Noir, valle de Dos d'ane	Árbol	3	
	Total			206	51
TOTAL				404	

En una primera aproximación, los cultivos aislados se clasificaron en base a la morfología que presentaban, pudiéndose agrupar de forma preliminar en trece grupos taxonómicos diferentes más un número de cepas que no pudo asignarse a ningún grupo por no mostrar ningún rasgo morfológico, ni macroscópico ni microscópico característico. En la **Tabla 13** podemos ver que los géneros más abundantes fueron *Streptomyces* (39,1%) y *Micromonospora* (34,6%). En el caso de las cepas de *Streptomyces*, no se observó ninguna diferencia significativa en las frecuencias relativas cuando se compararon los medioambientes frío y (sub)tropical (38,5% de Alaska, 38,9% de Hawaii y 39,3% de Reunión). Sin embargo, en el caso de las cepas de *Micromonospora*, se observó una mayor presencia en zonas tropicales (35,5% de Hawai y 38,3% de Reunión) que en zonas frías (23,1%).

Por otro lado, en el caso de las cepas de *Streptomyces* y de la familia *Micromonosporaceae* de líquenes de Hawai, se observaron diferencias en el número de cepas obtenidas entre los líquenes arbóreos y los rocosos. El porcentaje de *Streptomyces* de líquenes arbóreos fue superior (43,6%) que el de los aislados de rocas (33,3%), sucediendo lo contrario en el caso de las *Micromonosporaceae* donde el porcentaje de aislados de rocas fue de 43,6% frente a un 28,7% de líquenes arbóreos.

Además de las cepas de *Streptomyces* y de la familia *Micromonosporaceae*, también se aislaron cepas de otros taxones de la clase “*Actinobacteria*”, incluyendo miembros asignados provisionalmente a la familia *Pseudonocardiaceae*, especialmente procedentes de los líquenes de Alaska (26,9%) y de líquenes arbóreos de Hawai (18,1%), y también cepas de otras familias como *Thermomonosporaceae* y *Streptosporangiaceae*, mayoritariamente de muestras de Hawai (**Tabla 13**). Además, 51 cepas no pudieron asignarse a ningún taxón basándonos en su micromorfología, dado que no se diferenciaron en las condiciones de cultivo utilizadas. Es también reseñable el hecho de que algunos géneros minoritarios sólo se aislaron de ciertas muestras de líquenes recolectados en zonas únicas, como es el caso de las tres cepas de *Rhodococcus* spp. aisladas de líquenes de Alaska, la cepa de *Saccharopolyspora* sp. y de *Geodermatophilus* sp. de Hawai y las cepas de *Planobispora* sp. y de *Streptosporangium* sp. de Reunión.

Tabla 13. Distribución de cepas aisladas de líquenes procedentes de cada entorno geográfico y nicho ecológico. La asignación taxonómica fue establecida en base a la macro y micromorfología de los cultivos.

Familia	Género	ALASKA	HAWAI			REUNIÓN	TOTAL
		Roca	Árbol	Roca	Total	Árbol	
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Amycolatopsis</i>	-	-	-	-	1	1
	<i>Pseudonocardia</i>	1	-	1	1	5	7
	Indeterminado	6	16	-	16	1	23
	<i>Saccharopolyspora</i>	-	1	-	1	-	1
	Total	7	17	1	18	7	32
<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Actinoplanes</i>	-	-	3	3	3	6
	<i>Micromonospora</i>	6	27	31	58	76	140
	Total	6	27	34	61	79	146
<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i>	10	41	26	67	81	158
<i>Geodermatophilaceae</i>	<i>Geodermatophilus</i>	-	1	-	1	-	1
<i>Nocardiaceae</i>	<i>Nocardia</i>	-	1	-	1	-	1
	<i>Rhodococcus</i>	3	-	-	-	-	3
	Total	3	1	0	1	0	4
<i>Thermomonosporaceae</i>	<i>Actinomadura</i>	-	3	6	9	1	10
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Planobispora</i>	-	-	-	-	1	1
	<i>Streptosporangium</i>	-	-	-	-	1	1
	Total	-	-	-	-	-	2
	No identificados	-	4	11	15	36	51
	TOTAL	26	94	78	172	206	404

Como se ha descrito en Materiales y Métodos, se emplearon cuatro métodos de aislamiento diferentes, dos métodos generales ampliamente utilizados para el aislamiento de actinomicetos como son el método de dilución seriada y el de pretratamiento con calor seco (Agate y Bhat, 1963; Williams *et al.*, 1972) y otros dos métodos específicos como el tratamiento con agentes químicos como el cloruro de bencetonio (BC) o el gluconato de clorhexidina que son tratamientos específicos para el enriquecimiento en miembros de la familia *Streptosporangiaceae*, principalmente de los géneros *Streptosporangium* y *Microbispora* (Hayakawa *et al.*, 1991a y 1991b). Estos métodos de aislamiento se combinaron con tres medios selectivos diferentes y carentes de fuentes de carbono, comúnmente usados para el aislamiento de actinomicetos como son el medio basado en su contenido en ácido húmico HANOB (HV modificado) (Hayakawa y Nonomura, 1987a y 1987b), el medio NZ conteniendo NZamina como fuente de nitrógeno y el medio basado en extracto de suelo SE-2 Hayakawa y colaboradores (2000), suplementados con concentraciones subinhibitorias de los antibióticos ácido nalidíxico (20 µg/ml) o novobiocina (20 µg/ml), con el fin de reducir el número de bacterias unicelulares y favorecer el desarrollo de las esporas de actinomicetos y de sus colonias de lento crecimiento.

De los 404 cultivos seleccionados en este trabajo, el mayor número de cepas se obtuvo con el método de dilución (41,6%), ya que es el método menos selectivo, seguido por del tratamiento con calor seco (HOT) con un 31,9% de las cepas. Con el método de BC

se aisló un 21,8% de cepas y con el tratamiento con GC sólo se obtuvo un 4,7% de cepas (**Tabla 14**).

Tabla 14. Número de cepas aisladas de cada grupo taxonómico establecido según el método empleado y la presencia de cada antibiótico usado.

Familia	Género	Método					Medio		
		BC	DIL	GC	HOT	Total	ác. nalidíxico	novobiocina	Total
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Amycolatopsis</i>	-	1	-	-	1	-	1	1
	<i>Pseudonocardia</i>	1	4	-	2	7	6	1	7
	Indeterminado	-	3	-	20	23	14	9	23
	<i>Saccharopolyspora</i>	-	1	-	-	1	1	-	1
<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Actinoplanes</i>	-	3	-	3	6	-	6	6
	<i>Micromonospora</i>	57	43	6	34	140	70	70	140
<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i>	16	89	9	44	158	147	11	158
<i>Geodermatophilaceae</i>	<i>Geodermatophilus</i>	-	-	-	1	1	1	-	1
<i>Nocardiaceae</i>	<i>Nocardia</i>	-	1	-	-	1	1	-	1
	<i>Rhodococcus</i>	-	-	-	3	3	1	2	3
<i>Thermomonosporaceae</i>	<i>Actinomadura</i>	1	1	-	8	10	6	4	10
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Planobispora</i>	1	-	-	-	1	1	-	1
	<i>Streptosporangium</i>	1	-	-	-	1	1	-	1
	Indeterminados	11	22	4	14	51	33	18	51
	Total	88	168	19	129	404	282	122	404

Hay que destacar que la mayoría de las cepas de *Streptomyces* se aisló con el método de dilución, descendiendo el número de cepas aisladas con el uso del tratamiento con calor. En el caso de los miembros de la familia *Pseudonocardiaceae* y de las especies de *Actinomadura*, la mayoría de las cepas se obtuvo con el tratamiento con calor. El empleo de los métodos de BC y GC, no permitió el aislamiento de muchos miembros de la familia *Streptosporangiaceae*, aunque las únicas cepas de *Planobispora* y de *Streptosporangium*, fueron aisladas con el tratamiento con BC. Sin embargo, hay que destacar positivamente que el mayor número de cepas del género *Micromonospora* se obtuvo con el método de BC (40,7%).

En cuanto a la utilización de los dos antibióticos suplementado a los medios de aislamiento, hay que decir que, en general, el empleo de ácido nalidíxico fue menos restrictivo que la novobiocina puesto que sólo un 30,2% de las cepas pudo aislarse de medios con este antibiótico, mientras que el 69,8% de los cultivos se aislaron de medios con ácido nalidíxico (**Tabla 14**). En el caso de las cepas de *Streptomyces*, el 93% se aisló de medios con ácido nalidíxico y sólo un 7% se obtuvo de medios conteniendo novobiocina. Sin embargo, la única cepa asignada morfológicamente al género *Amycolatopsis* sp. y las 6 cepas de *Actinoplanes* spp. se aislaron únicamente de medios suplementados con novobiocina. Por otro lado tenemos que justo la mitad de las cepas del género *Micromonospora* se obtuvo de medios con ácido nalidíxico y la otra mitad de medios con novobiocina.

4.2. Caracterización y evaluación de la diversidad según el análisis de ácidos grasos (FAMES).

Con el fin de evaluar la diversidad de las cepas aisladas dentro de cada grupo taxonómico y para confirmar la identificación preliminar asignada a cada cepa, se llevó a cabo un análisis de la composición de sus ácidos grasos. Se pudo estudiar un total de 277 de las 404 cepas (68,6%) que fueron capaces de crecer en el medio TSBA que es el medio de referencia usado para estandarizar el crecimiento de los cultivos antes de la extracción de los ácidos grasos pero que no asegura el crecimiento de todas las cepas a estudiar. El número final de cepas analizadas fue de 143 cepas identificadas como *Streptomyces*, 72 cepas de *Micromonospora* y 22 cultivos no asignados inicialmente a ningún género. Los miembros de la familia *Pseudonocardiaceae* crecieron en este medio y por tanto pudieron analizarse, a excepción de una de las 7 *Pseudonocardia* spp.

Para poder estudiar la diversidad de las cepas analizadas, calculamos la matriz de distancias mediante el uso de distancias euclidianas y construimos un dendrograma con el método de UPGMA, a partir de una matriz de datos con los porcentajes de ácidos grasos de los 277 cultivos, donde se pudieron establecer claramente 8 grandes grupos (*clusters*). En la [Figura 7](#) se presenta el dendrograma obtenido con las ramas colapsadas con las cepas agrupadas de cada unos de los 8 grandes *clusters* formados. En el [Anexo 3](#) se incluye el dendrograma completo con las ramas sin colapsar. En este caso, estableciendo un punto de corte del 99% de similitud, los 277 cultivos se agrupan en 49 *clusters* distintos. Estos 49 *clusters* se agrupan a su vez en *clusters* mayores para dar lugar a los 8 grandes *clusters* que hemos mencionado en la Figura 7.

Los dos primeros grandes grupos estaban formados por miembros del género *Micromonospora*, el primero de los cuales (**cluster 1**) contenía un total de 38 cepas, de las cuales 34 se identificaron morfológicamente como *Micromonospora* agrupadas en los *subclusters* del 1 al 11 del dendrograma sin colapsar. Este *cluster* estaba formado por cepas procedentes de los 3 orígenes aunque claramente predominaban las cepas aisladas de Hawai. El segundo de los grupos (**cluster 2**) contenía 38 cepas del género *Micromonospora* más una cepa no asignada a ningún género, aunque este segundo grupo se distinguía claramente del primero, agrupadas en los *subclusters* 12 y 13. Además, podemos observar que este *cluster* agrupaba mayoritariamente las cepas de la isla de Reunión (35 cepas) junto con 4 cepas de Hawai.

El **cluster 3** corresponde a una única cepa con un perfil de ácidos grasos único que le hace separarse claramente del *cluster 2*. Esta cepa era una cepa sin identificar aunque con una macromorfología parecida a miembros de la familia *Micromonosporaceae*.

El **cluster 4** del dendrograma, que incluye los *subclusters* 15 al 20, está formado por 26 cepas mayoritariamente pertenecientes a la familia *Pseudonocardiaceae*, aisladas de muestras tropicales de Hawai y Reunión. Diecisiete de ellas sólo se pudieron identificar tentativamente, según su morfología, como miembros de la familia, y las restantes se

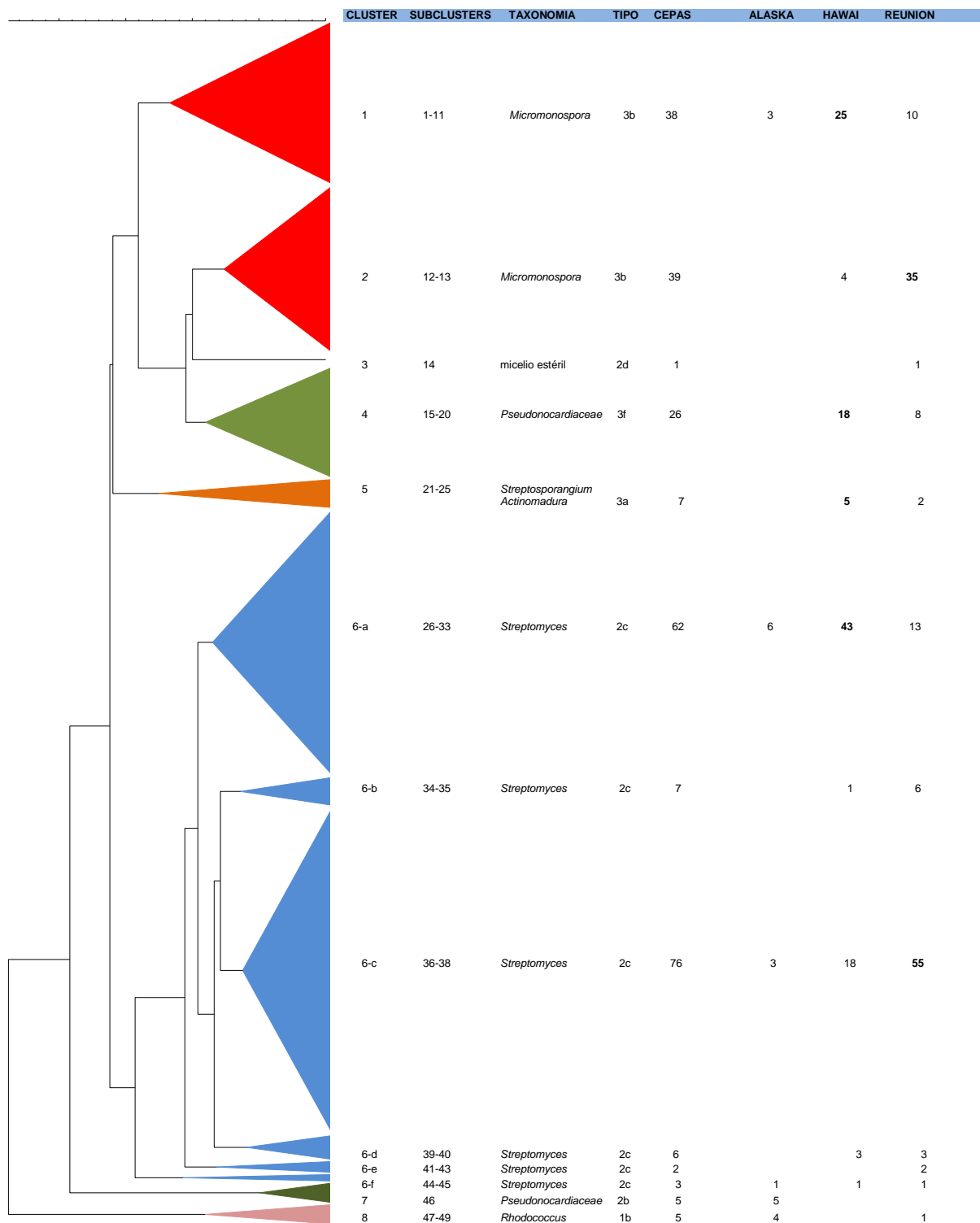
identificaron como pertenecientes al género *Amycolatopsis*, al género *Saccharopolyspora* y *Streptomyces* sp.

El **cluster 5**, que incluye los subclusters 21 al 25, estaba formado por 7 cepas, asignadas por su morfología a miembros de las familias *Streptosporangiaceae* (1 cepa), *Thermomonosporaceae* (5 cepas) y *Streptomyces* sp. Como en el *cluster* 4, todas las cepas provenían de líquenes tropicales, en concreto, 5 aisladas de Hawai y 2 de Reunión.

El **cluster 6** estaba formado por 156 cepas, 143 de las mismas identificadas morfológicamente como *Streptomyces*, más 9 cepas no identificadas y otros 4 cultivos más inicialmente asignados a otros géneros. En cuanto a los orígenes, este gran *cluster* contiene 10 cepas de Alaska, 66 cepas de Hawai y 80 de Reunión. Si se observa con un poco más de detalle este gran *cluster*, vemos que se pueden establecer 6 *clusters* menores, denominados 6-a, 6-b, 6-c, 6-d, 6-e y 6-f. El *cluster* 6-a, que incluye los *subclusters* 26 al 33 del dendrograma sin colapsar, está formado por 62 cepas de los tres orígenes aunque predominan claramente las cepas aisladas de Hawai (69,3%). El *cluster* 6-b (*subclusters* 34 y 35) está formado por sólo 7 cepas, todas ellas aisladas de líquenes tropicales, aunque mayoritariamente de Reunión. El *cluster* 6-c (*subclusters* 36, 37 y 38), está integrado por 76 cepas de los tres orígenes, aunque en este caso, al contrario que en el *cluster* 6-a, las cepas que predominan son las aisladas de los líquenes de Reunión (72,4%). El *cluster* 6-d (*subclusters* 39 y 40) estaba formado por 6 cepas de líquenes tropicales, 3 de Hawai y otros 3 de Reunión. El *cluster* 6-e (*subclusters* 41, 42 y 43) contenía 3 cultivos, también de muestras tropicales, 1 de Hawai y 2 de Reunión. Por último, el *cluster* 6-f (*subclusters* 44 y 45), estaba constituido sólo por dos cepas, 1 de Alaska y otra de Reunión. Las cepas de *Streptomyces* también presentan una cierta tendencia a agruparse según su origen. En concreto, podemos ver que el 65,1% de los *Streptomyces* aislados de Hawai se agrupan en el *cluster* 6-a, mientras que el 68,7% de los *Streptomyces* aislados de Reunión se integran en el *cluster* 6-c.

En el **cluster 7**, formado por el subcluster 46, podemos ver un segundo grupo de cepas pertenecientes a la familia *Pseudonocardiaceae*, aunque claramente separado del *cluster* 4 y por tanto con una composición en ácidos grasos diferente. Este *cluster* contiene 5 cepas, todas ellas aisladas de líquenes de Alaska, al contrario de lo que sucede en el *cluster* 4 que contenía sólo cepas de zonas tropicales. Además el *cluster* 4, parecía estar formado por cepas relacionadas con el género *Amycolatopsis*, mientras que el *cluster* 7 parece contener cepas relacionadas con el género *Pseudonocardia*. Por último, el **cluster 8** contiene 3 cepas de *Rhodococcus* spp. y 1 cepa identificada inicialmente como miembro de la familia *Pseudonocardiaceae*, todos ellos aislados de muestras de Alaska, más 1 micelio estéril aislado de Reunión. Este último *cluster* incluía los subclusters 47, 48 y 49.

Figura 7: Diversidad de los cultivos en base a la composición en ácidos grasos. El dendrograma se ha construido calculando las distancias euclídeanas y el método de UPGMA.



Una vez establecidos los 8 grandes grupos en el dendrograma, estudiamos detalladamente la composición de los ácidos grasos de cada uno de estos *clusters* para determinar los ácidos grasos diagnóstico de cada uno de ellos y tratar así de establecer una correlación entre la identificación morfológica llevada a cabo con la clasificación taxonómica establecida por Kroppenstedt (Kroppenstedt, 1985). En la **Tabla 15** se muestra la composición de los ácidos grasos diagnóstico y mayoritarios de cada uno de los 8 *clusters* establecidos en el dendrograma. En el **Anexo 2** puede verse la composición de cada uno de los ácidos grasos mayoritarios detectados en cada una de las cepas de cada *clusters*.

En general, por término medio podemos decir que el número de ácidos grasos de cada cepa oscila entre 14 y 20, variando este número según el grupo taxonómico, desde el número mínimo de 9 en el caso de las cepas de *Rhodococcus* a un máximo de 30 en el caso de las cepas de *Micromonospora* del *cluster* 2, con las excepciones de una cepa de *Streptomyces* que presentaba un máximo de 42 ácidos grasos y una *Nocardia* con 30.

Como hemos mencionado anteriormente, la clasificación de Kroppenstedt (Kroppenstedt, 1985) basada en la composición de los ácidos grasos, agrupa los actinomicetos en 3 grandes tipos, en los que se distinguen además un total de 14 subtipos. Estos tipos y subtipos se establecen en función de las dos rutas de biosíntesis utilizadas por los microorganismos para sintetizar los diferentes ácidos grasos, una de ellas implicada en la síntesis de ácidos grasos saturados, insaturados y los derivados 10-metílicos y la otra implicada en la síntesis de los ácidos grasos del tipo *iso* y *anteiso* que se caracterizan por una ramificación terminal de la cadena.

En nuestro caso, los perfiles de ácidos grasos confirmaron, en casi todos los casos, la asignación del género de las cepas identificadas según su micromorfología, ya que cada uno de los *clusters* pudo correlacionarse perfectamente con algún tipo y subtipo del sistema de referencia de Kroppenstedt. Asimismo, el perfil de ácidos grasos permitió asignar una posición taxonómica a las cepas estériles que no se diferenciaban en el medio de identificación usado o incluso, cepas que se habían asignado erróneamente a algún otro taxón debido a la dificultad de distinguir entre algunos géneros según su micromorfología, pudieron reclasificarse correctamente.

Según vemos en la **Tabla 15**, los 5 primeros *clusters* corresponden a cepas pertenecientes a géneros clasificados como del **tipo 3** según el sistema de clasificación de Kroppenstedt, con representantes de los géneros *Micromonospora*, *Amycolatopsis*, *Actinomadura*, *Streptosporangium*, etc. con excepción del *cluster* 3 formado por una única cepa que tiene un perfil de ácidos grasos que se parece al tipo 2d (géneros *Actinoplanes*, *Asanoa*, *Krasilnikovia*, *Pilimelia* y otros). Los géneros con ácidos grasos del **tipo 3** se caracterizan por la presencia de ácidos grasos insaturados (sobre todo 17:1 ω 8c), del tipo *iso* (sobre todo 16:0 *iso*) y del tipo 10-metilo (sobre todo 17:0 10-metilo).

Los *clusters* 6 y 7 corresponden a cepas pertenecientes al **tipo 2**, con representantes de los géneros *Streptomyces*, *Pseudonocardia* y otros, las cuales se caracterizan por tener ácidos grasos del tipo *iso* (sobre todo 16:0 *iso*) y *anteiso* (15:0 *anteiso* y 17:0 *anteiso*) y

ausencia total o presencia muy minoritaria de ácidos grasos saturados, insaturados y del tipo 10-metilo.

Por último el *cluster* 8 está formado por cepas que se clasifican, según su composición en ácidos grasos, como del **tipo 1**, con representantes de los géneros *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Gordonia*, etc que se caracterizan por la presencia de ácidos grasos saturados (sobre todo 16:0), insaturados (sobre todo 18:1 ω 9c) y del tipo 10-metilo (sobre todo 18:0 10-metilo-ácido tuberculoesteárico), y ausencia total del tipo *iso* y *anteiso*.

Los *clusters* 1 y 2 están formados por cepas pertenecientes al género *Micromonospora* que se caracterizan por ser ricas en ácidos grasos ramificados del tipo *iso* (15:0 *iso* y 16:0 *iso*) y *anteiso* (15:0 *anteiso* y 17:0 *anteiso*), y por ácidos grasos ramificados del tipo 10-metil (10-metil 17:0), pero también se caracterizan por la presencia de ácidos grasos lineales insaturados (17:1 ω 8c) y también saturados (17:0). Aunque estos ácidos grasos se encuentran presentes en ambos *clusters*, podemos ver que entre uno y otro existen diferencias cuantitativas en algunos de ellos (17:0, 17:1 ω 8c, 15:0 *iso*, 16:0 *iso*, 17:0 *iso* C, 17:0 *anteiso*, 10-metil 17:0), así como diferencias cualitativas (16:0, 16:1 ω 7c, 14:0 *iso* y 16:1 *iso* H presentes en el *cluster* 2) que permiten separar ambos grupos de cepas de *Micromonospora*.

La única cepa presente en el *cluster* 3 tiene una morfología muy parecida a las cepas de *Micromonospora* de los *clusters* 1 y 2 pero una composición en ácidos grasos suficientemente distinta como para separarse de las anteriores. Los ácidos grasos detectados en este cultivo, son similares a los descritos para otros géneros de la familia *Micromonosporaceae* con ácidos grasos del tipo 2, como los géneros *Actinoplanes*, *Krasilnikovia* o *Pseudosporangium* con lo que podríamos asignar una afiliación taxonómica a esta cepa desconocida. Esta cepa tiene un perfil muy parecido a las del género *Micromonospora*, pero en este caso no se detectaron ácidos grasos del tipo 10-metilo y además se observan algunas diferencias cuantitativas en algunos ácidos grasos como el 16:0 y 18:0, 16:1 ω 7c y 18:1 ω 9c o el 14:0 *iso*.

Entre las cepas del *cluster* 4, asignados en principio a la familia *Pseudonocardiaceae*, aunque sin poder definir a qué género en concreto, podemos ver que se caracterizan por la presencia de grandes cantidades de ácidos grasos ramificados del tipo *iso* y *anteiso* (15:0 *iso* y *anteiso*, 16:0 *iso* y 17:0 *anteiso*), así como ácidos grasos de cadena lineal y saturados (16:0, 17:0 y 18:0 pero sobre todo 15:0) e insaturados (17:1 ω 8c), ácidos grasos del tipo 10-metilo (10-metilo 16:0 y 10-metilo 17:0) y posiblemente algunas cantidades de 2-hidoxi 15:0 *iso*. La presencia de estos últimos ácidos grasos (ramificados del tipo *iso* 2-hidoxi y ácidos grasos ramificados del tipo *iso* 10-metil) sugerirían que estas cepas pudieran ser en principio asignadas al género *Amycolatopsis* y/o al género *Saccharothrix* (Kroppenstedt, 1992), aunque las cantidades de los ácidos grasos 17:0 y 17:1 ω 8c son más parecidas a las cepas del tipo 3f (*Amycolatopsis*) que a las del tipo 3g (*Saccharothrix*).

Las cepas de los géneros *Actinomadura* y *Streptosporangium* forman el *cluster* 5 y presentan perfiles característicos que incluyen ácidos grasos de cadena lineal tanto

saturados como insaturados, ácidos grasos ramificados en sus extremos del tipo *iso* y también con ramificaciones del tipo 10-metilo así como ácidos grasos hidroxilados.

Las cepas de *Streptomyces* forman el *cluster* 6 y se caracterizan claramente por la presencia de pocas cantidades de ácidos grasos saturados e insaturados y por el contrario grandes cantidades de ácidos grasos ramificados en el extremo del tipo *iso* y *anteiso*, especialmente las especies 15:0 *anteiso* (10-52%) y 16:0 *iso* (3-34%), aunque las especies 15:0 *iso* (2-30%) y 17:0 *anteiso* (1-19%) también son muy abundantes. Además, los ácidos grasos del tipo 10-metilo y 2-hidroxilo se detectan en muy poco casos y en cantidades muy pequeñas.

El *cluster* 7 está también formado por cepas pertenecientes a la familia *Pseudonocardiaceae* como los del *cluster* 4 aunque con una composición en ácidos grasos totalmente distinta, siendo la del *cluster* 7 muy parecida a la descrita para las cepas del género *Pseudonocardia*. Por ejemplo, en este caso tenemos una ausencia total de ácidos grasos saturados y cantidades muy pequeñas de ácidos grasos insaturados (16:1 ω 7c) o del tipo 10-metilo (10-metil 17:0). Sin embargo, sí son más ricos en ácidos grasos del tipo *iso* y además insaturados como el 16:1 *iso* H (27-39%) y 17:1 *iso* C (5-9%).

Finalmente, las cepas del *cluster* 8 son ricas en el ácido graso saturado 16:0 y también del insaturado 18:1 ω 9c. Además, se caracterizan por la presencia de pequeñas cantidades de ácido tuberculoesteárico (10-metil 18:0), así como un alto contenido de una mezcla de ácidos grasos insaturados (16:1 ω 7t) y de ácidos grasos del tipo 2-hidroxi (2OH 15:0 *iso*), que no se pueden resolver con precisión con las condiciones cromatográficas usadas. Este perfil de ácidos grasos se identifica como el tipo 1b que se corresponde con los géneros *Nocardia*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* y *Tsukamurella*.

Tabla 15: Ácidos grasos diagnóstico y mayoritarios presentes en las cepas analizadas.

Taxonomía inicial	Grupo (1)	Cluster	Saturados				Insaturados			iso						anteiso	
			15:0	16:0	17:0	18:0	16:1 ω7c	17:1 ω8c	18:1 ω9c	14:0 ISO	15:0 ISO	16:0 ISO	16:1 ISO H	17:0 ISO	17:1 ISO C	15:0 ANTEISO	17:0 ANTEISO
<i>Micromonospora</i>	3b	1	0-11		1-7			4-35	0-3		19-50	2-27		1-10	2-25	1-9	1-14
<i>Micromonospora</i>	3b	2	1-9	0-1	2-13		0-1	7-19	0-4	1-3	9-29	17-40	0-2	1-4	0-6	1-9	1-9
<i>Actinoplanes</i>	2d	3	2	4	5	2	6	11	12	5	20	13	1	1	1	10	3
<i>Pseudonocardiaceae</i> (<i>Amycolatopsis</i>)	3f	4	0-10	0-8	0-6	0-2	0-6	0-15		0-9	6-11	29-43	0-17	0-5		1-5	1-14
<i>Streptosporangium</i> / <i>Actinomadura</i>	3a	5	4-15	3-28	0-6	0-2	5-20	4-13	1-12	1-9	0-1	9-20	0-2			0-1	
<i>Streptomyces</i>	2c	6	0-6	0-11			0-10			0-36	2-30	3-34	0-17	0-7	0-9	10-52	1-19
<i>Pseudonocardiaceae</i> (<i>Pseudonocardia</i>)	2b	7					2-7			2-4	6-10	31-33	27-39	2-4	5-7	1	2-3
<i>Rhodococcus</i>	1b	8	0-5	20-31			0-9	0-4	7-14								

Taxonomía inicial	Grupo (1)	Cluster	10-metil				2-OH			17:0 CYCLO	MEZCLA DE ACIDOS GRASOS #4
			16:0 10METHYL	17:0 10METHYL	17:0 ISO 10METHYL	18:0 10METHYL (TBSA)	16:0 2OH	16:0 ISO 2OH	17:0 ISO 2OH		
<i>Micromonospora</i>	3b	1		1-30		0-2					
<i>Micromonospora</i>	3b	2		6-18		0-1					
<i>Actinoplanes</i>	2d	3									
<i>Pseudonocardiaceae</i> (<i>Amycolatopsis</i>)	3f	4	0-2	0-5	0-9					0-19	0-6
<i>Streptosporangium</i> / <i>Actinomadura</i>	3a	5	1-9	4-18		0-6	0-11	0-14		0-15	
<i>Streptomyces</i>	2c	6				0-2			0-6	0-10	0-8
<i>Pseudonocardiaceae</i> (<i>Pseudonocardia</i>)	2b	7		1							
<i>Rhodococcus</i>	1b	8	0-3	0-1		7-11					19-36

(1): según Kroppenstedt, 1985.

En rojo: ácidos grasos diagnóstico según Kroppenstedt, 1985.

En negrita: ácidos grasos más abundantes.

En el Apéndice 2 puede verse la nomenclatura de los ácidos grasos según la IUPAC.

4.3. Secuenciación del gen ribosomal 16S rADN.

Una vez determinada la posición taxonómica inicial basada en la morfología de las cepas junto con el perfil de ácidos grasos, y la posición taxonómica de muchos cultivos estériles o que habían sido mal asignados según su morfología, se determinó la secuencia parcial de unos 900-1000nt, entre las posiciones 27 y 1100 del gen ribosomal 16S de un grupo de 222 cepas. Esta secuencia parcial incluía cinco de las seis regiones variables presentes en la secuencia del gen 16S ADNr correspondientes a las posiciones nucleotídicas 170-230, 430-580, 560-640, 790-830 y 960-1020 del gen 16S ADNr de *Streptomyces ambofaciens* 16s rDNA gene (Pernodet *et al.*, 1989). Dos de estas secuencias corresponden a las regiones γ y α , descritas para el género *Streptomyces* (Stackebrandt *et al.*, 1991; Stackebrandt *et al.*, 1992). Dicho grupo incluía 211 de las 277 cepas analizadas por FAMES con representantes de todos los *clusters*, y otras 11 cepas adicionales que incluían 6 miembros de la familia *Pseudonocardiaceae*, 3 *Streptomyces* spp. y 2 *Actinoplanes* spp, que no habían podido ser estudiados por FAMES.

En la **Tabla 16** se incluyen las diferentes identificaciones taxonómicas resultantes de la comparación de las secuencias mediante EzTaxon (<http://www.eztaxon.org/>; Chun *et al.*, 2007; <http://www.ezbiocloud.net/eztaxon>; Kim *et al.*, 2012).

Tabla 16: Asignación de especies a los 222 cultivos secuenciados según el resultado del análisis de EzTaxon y distribución de las especies identificadas según sus lugares de aislamiento: frecuencia de cepas aisladas de una única procedencia o de más de un origen.

FAMILIA	ORIGEN CEPA	TIPO LIQUEN	ESPECIE MÁS CERCANA	ALASKA	HAWAI	REUNION	TOTAL
Micromonosporaceae	Único	Árbol	<i>Actinoplanes deccanensis</i> IFO 13994 ^T		1		1
		Roca	<i>Micromonospora chalcea</i> DSM 43026 ^T		1		1
		Árbol	<i>Micromonospora lupini</i> lupac 14N ^T		1		1
		Árbol	<i>Micromonospora tulbaghia</i> TVU1 ^T		2		2
	Único	Árbol	<i>Actinoplanes cyaneus</i> DSM 46137 ^T			1	1
		Árbol	<i>Actinoplanes digitatis</i> IFO 12512 ^T			1	1
		Árbol	<i>Micromonospora aurantiaca</i> ATCC 27029 ^T			2	2
		Árbol	<i>Micromonospora humi</i> P0402 ^T			27	27
		Árbol	<i>Micromonospora peucetia</i> DSM 43363 ^T			7	7
	Varios	Árbol	<i>Pseudosporangium ferrugineum</i> 3-44-a-19 ^T			1	1
Árbol / Roca		<i>Micromonospora chokoriensis</i> 2-19/6 ^T		9	4	13	
	Árbol / Roca	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 ^T	2	8	4	14	
TOTAL				2	22	47	71
Nocardiaceae	Único	Roca	<i>Gordonia sputi</i> DSM 43896 ^T	3			3
		Roca	<i>Nocardia iowensis</i> UI 122540 ^T	1			1
	TOTAL				4		4
Pseudonocardiaceae	Único	Roca	<i>Pseudonocardia alni</i> DSM 44104 ^T	4			4
	Único	Roca	<i>Amycolatopsis saalfeldensis</i> HKI0457 ^T		1		1
		Roca	<i>Pseudonocardia acaciae</i> GMKU095 ^T		1		1
		Roca	<i>Pseudonocardia alaniniphila</i> YIM 16303 ^T		1		1
		Árbol	<i>Saccharothrix texasensis</i> NRRL B-16107 ^T		1		1
	Único	Árbol	<i>Actinomycespora chlora</i> TT07I-57 ^T			1	1
		Árbol	<i>Actinomycespora lutea</i> TT00-04 ^T			2	2
Árbol		<i>Amycolatopsis lexingtonensis</i> NRRL B-24131 ^T			1	1	

FAMILIA	ORIGEN CEPA	TIPO LIQUEN	ESPECIE MÁS CERCANA	ALASKA	HAWAI	REUNION	TOTAL
		Árbol	<i>Amycolatopsis thermalba</i> SF45 ^T		1		1
	Varios	Árbol	<i>Amycolatopsis kentuckyensis</i> NRRL B-24129 ^T	1	4		5
		Árbol	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> NRRL B-24133 ^T	14	1		15
	TOTAL			4	18	10	32
Streptomycetaceae	Único	Roca	<i>Streptomyces atrovirens</i> NRRL B-16357 ^T	1			1
		Roca	<i>Streptomyces glauciniger</i> NBRC 100913 ^T	2			2
	Único	Árbol	<i>Streptomyces ambofaciens</i> ATCC 23877 ^T		1		1
		Roca	<i>Streptomyces bambergiensis</i> NBRC 13479 ^T		1		1
		Roca	<i>Streptomyces caniferus</i> NBRC 15389 ^T		1		1
		Árbol	<i>Streptomyces carpinensis</i> NBRC 14214 ^T		1		1
		Árbol	<i>Streptomyces cremeus</i> NBRC 12760 ^T		1		1
		Árbol	<i>Streptomyces flavovirens</i> NBRC 3716 ^T		1		1
		Roca	<i>Streptomyces fumanus</i> NBRC 13042 ^T		1		1
		Árbol	<i>Streptomyces galbus</i> DSM 40089 ^T		1		1
		Roca	<i>Streptomyces gelaticus</i> NRRL B-2928 ^T		1		1
		Árbol	<i>Streptomyces glomeroaurantiacus</i> NBRC 15418 ^T		1		1
		Roca	<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i> NBRC 15440 ^T		1		1
		Roca	<i>Streptomyces griseoplanus</i> AS 4.1868 ^T		1		1
		Árbol	<i>Streptomyces halstedii</i> NBRC 12783 ^T		2		2
		Árbol	<i>Streptomyces lienomycini</i> LMG 20091 ^T		3		3
		Árbol	<i>Streptomyces longwoodensis</i> LMG 20096 ^T		1		1
		Árbol	<i>Streptomyces murinus</i> NBRC 12799 ^T		1		1
		Roca	<i>Streptomyces mutomycini</i> NBRC 100999 ^T		1		1
		Roca	<i>Streptomyces netropsis</i> NBRC 3723 ^T		1		1
		Árbol	<i>Streptomyces niveoruber</i> NBRC 15428 ^T		2		2
		Árbol	<i>Streptomyces niveus</i> NRRL 2466 ^T		1		1
		Árbol / Roca	<i>Streptomyces nogalater</i> JCM 4799 ^T		2		2

FAMILIA	ORIGEN CEPA	TIPO LIQUEN	ESPECIE MÁS CERCANA	ALASKA	HAWAI	REUNION	TOTAL
		Roca	<i>Streptomyces novaecaesareae</i> NBRC 13368 ^T		2		2
		Roca	<i>Streptomyces pulveraceus</i> LMG 20322 ^T		1		1
		Árbol	<i>Streptomyces silaceus</i> NRRL B-24166 ^T		1		1
		Roca	<i>Streptomyces sporoclivatus</i> NBRC 100767 ^T		2		2
		Árbol	<i>Streptomyces tendae</i> ATCC 19812 ^T		3		3
		Árbol	<i>Streptomyces violaceolatus</i> DSM 40438 ^T		1		1
		Árbol / Roca	<i>Streptomyces violascens</i> NBRC 12920 ^T		4		4
		Roca	<i>Streptomyces xanthochromogenes</i> NRRL B-5410 ^T		2		2
	Único	Árbol	<i>Streptomyces axinellae</i> PoI001 ^T			1	1
		Árbol	<i>Streptomyces caelestis</i> NRRL 2418 ^T			1	1
		Árbol	<i>Streptomyces chartreusis</i> NBRC 12753 ^T			2	2
		Árbol	<i>Streptomyces cirratus</i> NRRL B-3250 ^T			1	1
		Árbol	<i>Streptomyces coeruleorubidus</i> NBRC 12844 ^T			1	1
		Árbol	<i>Streptomyces globisporus</i> subsp. <i>globisporus</i> NRRL B-2293 ^T			1	1
		Árbol	<i>Streptomyces gramineus</i> JR-43 ^T			1	1
		Árbol	<i>Streptomyces libani</i> subsp. <i>rufus</i> LMG 20087 ^T			2	2
		Árbol	<i>Streptomyces lydicus</i> NBRC 13058 ^T			1	1
		Árbol	<i>Streptomyces neopeptinius</i> KNF 2047 ^T			4	4
		Árbol	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> NBRC 3178 ^T			12	12
		Árbol	<i>Streptomyces phaeoluteichromatogenes</i> NRRL 5799 ^T			1	1
		Árbol	<i>Streptomyces purpurascens</i> NBRC 13077 ^T			2	2
		Árbol	<i>Streptomyces seoulensis</i> NBRC 16668 ^T			9	9
		Árbol	<i>Streptomyces vinaceus</i> NBRC 13425 ^T			1	1
		Árbol	<i>Streptomyces virginiae</i> NBRC 12827 ^T			1	1
	Varios	Árbol	<i>Streptomyces arenae</i> NBRC 13016 ^T		3	1	4
		Árbol / Roca	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> NBRC 15399 ^T	1	1		2
		Árbol / Roca	<i>Streptomyces drozdowiczii</i> NBRC 101007 ^T		2	1	3

FAMILIA	ORIGEN CEPA	TIPO LIQUEN	ESPECIE MÁS CERCANA	ALASKA	HAWAI	REUNION	TOTAL
		Árbol / Roca	<i>Streptomyces misionensis</i> NBRC 13063 ^T		1	6	7
		Árbol / Roca	<i>Streptomyces pactum</i> NBRC 13433 ^T	1	1		2
		Árbol / Roca	<i>Streptomyces recifensis</i> NBRC 12813 ^T	2		1	3
		Roca	<i>Streptomyces thinghirensis</i> DSM 41919 ^T	1	1		2
	TOTAL			8	51	50	109
Streptosporangiaceae	Único	Árbol	<i>Streptosporangium longisporum</i> DSM 43180 ^T			2	2
Thermomonosporaceae	Único	Árbol	<i>Actinomadura fulvescens</i> IFO 14347 ^T		1		1
		Roca	<i>Actinomadura madurae</i> DSM 43067 ^T		2		2
	TOTAL				3		3
TOTAL				18	95	109	222

El análisis de la distribución de las diversas especies aisladas en función de su procedencia permitió evaluar si existen cepas que están ampliamente distribuidas en los distintos entornos y localizaciones geográficas (cepas cosmopolitas) o bien si existen cepas, asignadas a determinadas especies, que sólo pueden aislarse de lugares o entornos concretos (cepas endémicas). En la **Tabla 16**, podemos ver que 71 de las 82 especies aisladas (86,6%) se obtienen de una única localización geográfica, mientras que 11 de las especies son más ubicuas y se pueden aislar de más de un origen geográfico. Consecuentemente, el número de cepas que se aíslan de un solo lugar son también mucho más abundantes, aislándose 152 cepas endémicas (68,5%) frente a 70 cepas cosmopolitas.

4.4. Reclasificación de cepas según los análisis de FAMEs y de la secuenciación del 16S.

El análisis de ácidos grasos y/o la secuenciación del gen ribosomal 16S ARNr nos han permitido reclasificar 62 cepas (15,3% del total de cepas estudiadas en este trabajo) que fueron mal identificadas según su morfología y también asignar a un taxón aquellas cepas que no pudieron serlo debido a la falta de diferenciación en las condiciones de cultivo empleadas para su identificación. La identificación de 46 de estas 62 cepas se obtuvo por el perfil de ácidos grasos, confirmándose posteriormente también su identificación por la secuencia 16S ADNr. Otras 10 cepas se identificaron o reclasificaron sólo según sus perfiles de ácidos grasos mientras que otras 6 cepas lo hicieron en base a los datos de secuenciación.

4.5. Análisis filogenético de las cepas de actinomicetos identificados.

El análisis filogenético de las cepas basado en las secuencias parciales ha confirmado los resultados obtenidos con el análisis de la composición de ácidos grasos, presentando los árboles generados por ambas aproximaciones la misma topología general con grandes ramas que agrupan las distintas familias de actinomicetos aislados de líquenes (**Figura 8**).

Los árboles filogenéticos también nos muestran que las cepas asignadas a la misma especie se agrupan generalmente en la misma rama, muchas de las cuales están formadas por cepas aisladas de diferentes localizaciones geográficas. Además, no sólo encontramos cepas de la misma especie y del mismo origen agrupadas en ramas homogéneas sino que estas cepas se han aislado de un único lugar.

Los rangos de similitud de secuencia interespecíficos que se han obtenido para las secuencias parciales del gen 16S rRNA han sido los que se muestran en la **Tabla 17**.

Tabla 17: Rangos de los valores de similitud interespecíficos para cada uno de los géneros.

Género	Mínimo (%)	Máximo (%)
Actinoplanes	96,64	97,62
Micromonospora	96,11	100
Actinomyces	98,17	99,69
Amycolatopsis	92,83	100
Pseudonocardia	94,29	100
Streptomyces	93,33	100
Actinomadura	98,29	100
Streptosporangium *	99,89	
Gordonia **	100	

* sólo hay 2 cepas

** único valor entre las 3 cepas

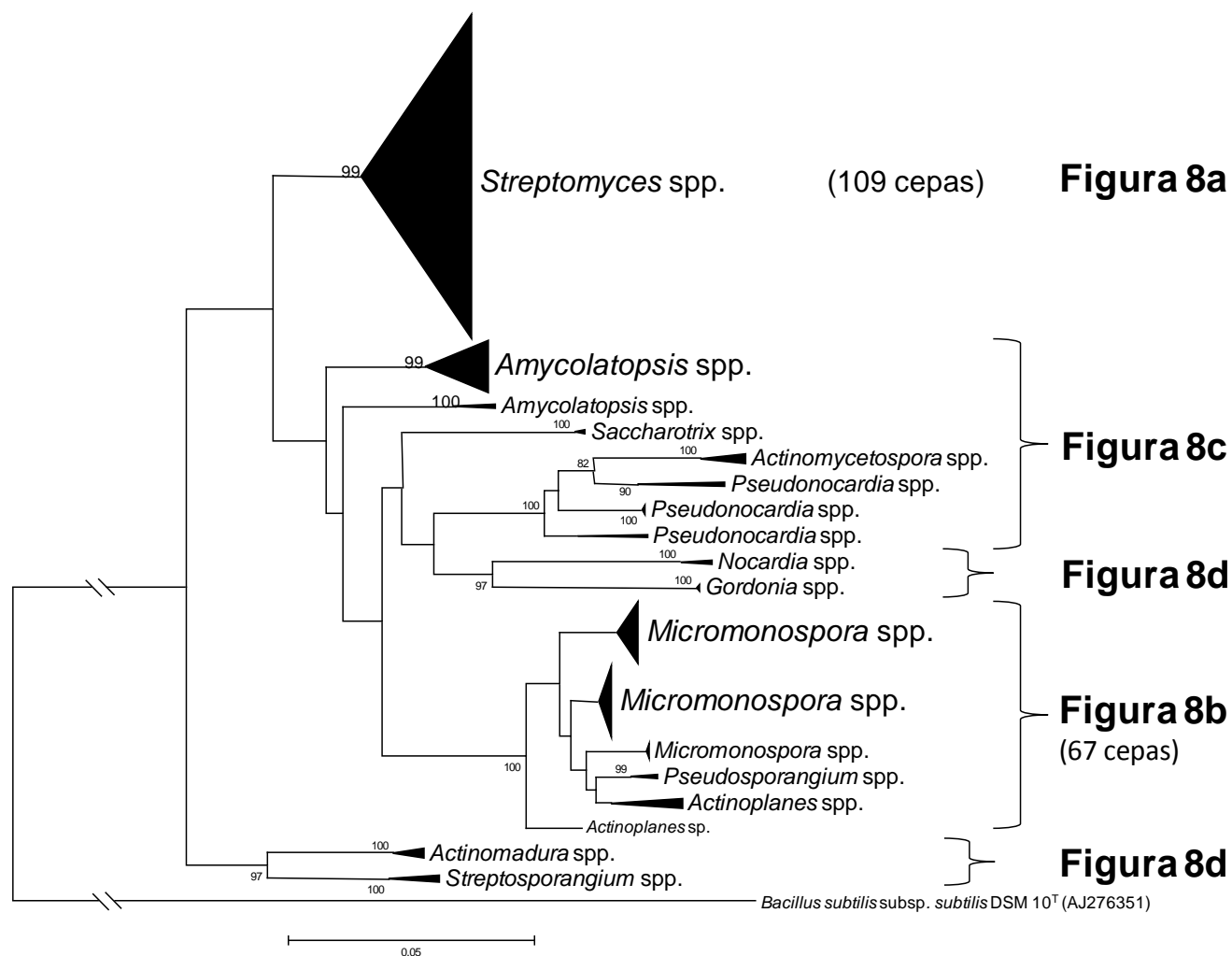
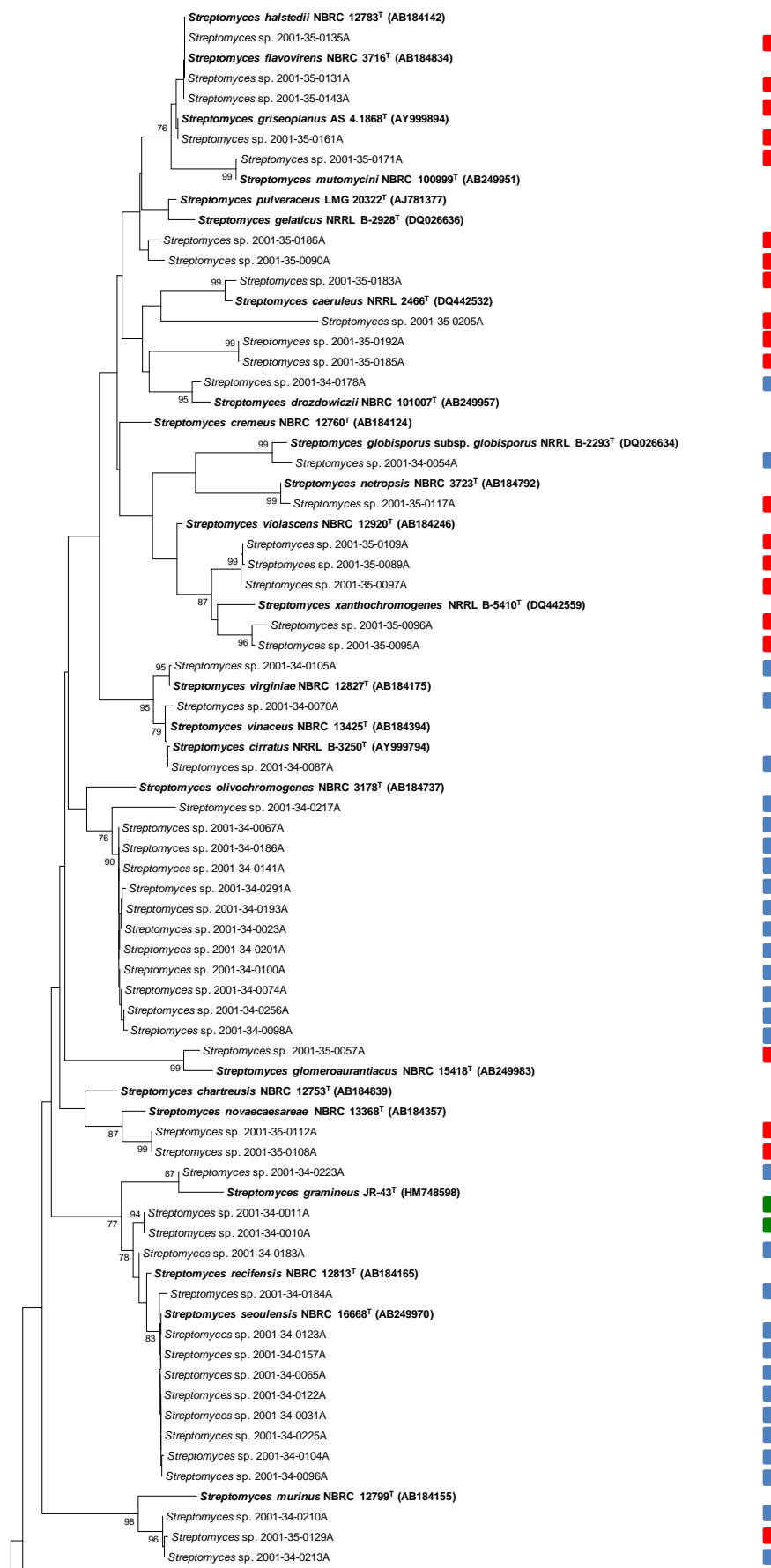


Figura 8: Árbol filogenético con las ramas colapsadas obtenido mediante el método de Neighbour Joining (NJ) basado en las secuencias parciales del gen 16S ARNr de las 222 cepas salvajes y de las 82 cepas tipo incluidas en el estudio. El número de la barra se corresponde con el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o mayores al 75% como porcentaje de 1000 pseudorréplicas.

En la **Figura 8a**, observamos cepas de *Streptomyces* de una misma especie que sólo se han aislado de ciertas muestras de líquenes procedentes de sitios concretos como las 9 cepas aisladas de Reunión asociadas a *S. seoulensis* NBRC 16668^T que se agrupan en una rama, las 12 cepas asociadas a *S. olivochromogenes* NBRC 3178^T aisladas también exclusivamente de líquenes de Reunión, o 2 cepas asociadas a *S. novaecaesareae* NBRC 13368^T, y otras 2 asociadas a *S. sporoclivatus* NBRC 100767^T aisladas sólo de líquenes de Hawai, o 2 cepas asociadas a *S. glauciniger* NBRC 100913^T obtenidas de líquenes procedentes de Alaska. En otros casos se observan ramas formadas por la misma especie pero integradas por cepas provenientes de varias localizaciones como son los casos de las cepas asociadas a *S. misionensis* NBRC 13063^T, 4 de las cuales provienen de Reunión y 1 de Hawai o las asociadas a *S. arenae* NBRC 13016^T con 3 cepas de Hawai y una de Reunión.

Figura 8a: Árbol filogenético de las 109 cepas de *Streptomyces* spp. y de las 54 cepas tipo incluidas en el estudio, obtenido mediante el método de NJ basado en las secuencias parciales del gen 16S ARNr. El número de la barra se corresponde con el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o mayores al 75% como porcentaje de 1000 pseudorréplicas (páginas 118-119).

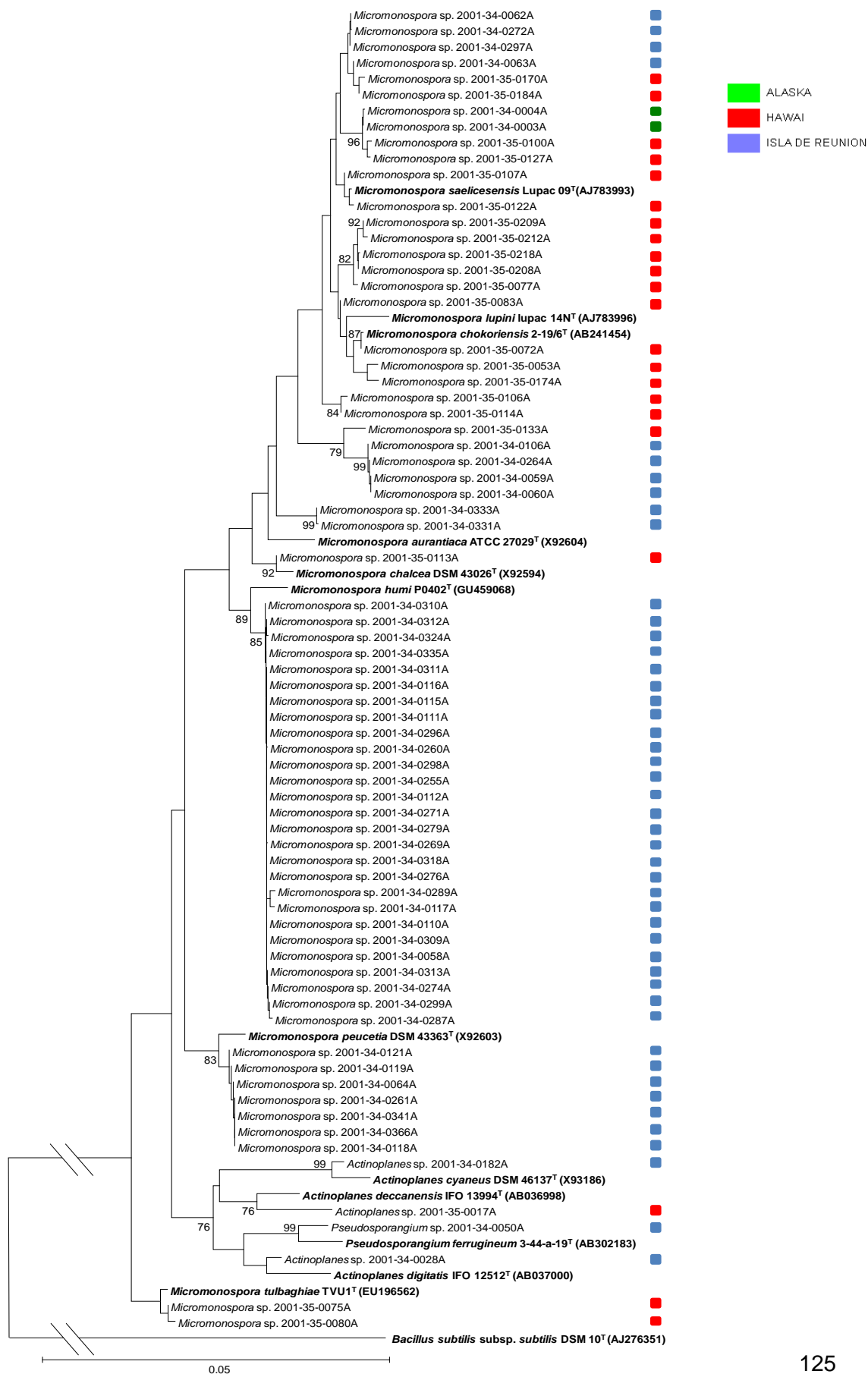




Las cepas la familia *Micromonosporaceae* (Figura 8b) se reparten en 12 clados, asociado cada uno de ellos con una cepa tipo. Un primer clado contiene 12 cepas aisladas de los tres orígenes que se asocian a la cepa tipo de *Micromonospora saelicesensis* Lupac 09^T. A continuación encontramos otra rama con 9 cepas aisladas de Hawai, asociadas a las cepas tipo *M. chokoriensis* 2-19/6^T y *M. lupini* lupac 14N^T. En una rama independiente y separada de la anterior, tenemos 4 cepas asociadas a *M. chokoriensis* 2-19/6^T pero aisladas de Reunión. A mayor distancia, vemos una rama formada por dos cepas de Reunión que se asocian con la cepa tipo *M. aurantiaca* ATCC 27029^T, seguida a una cepa de Hawai que se agrupa en la misma rama con la cepa tipo *M. chalcea* DSM 43026^T. Las 27 cepas asociadas a *M. humi* P0402, aisladas de Reunión, se unen en gran rama junto con la cepa tipo de esta especie. Seguidamente, y alejada de las ramas anteriores, encontramos un clado con 7 cepas de Reunión que se asocian a la cepa tipo *M. peucetia* DSM 43363^T. A continuación vemos una gran rama formada por las 3 cepas de *Actinoplanes* y una cepa de *Pseudosporangium*, asociadas cada una de ellas en un clado independiente junto con la cepa tipo de la especie. Finalmente, tenemos una última rama con dos cepas de Hawai y asociadas a la cepa tipo *Micromonospora tulbaghia* TVU1^T.

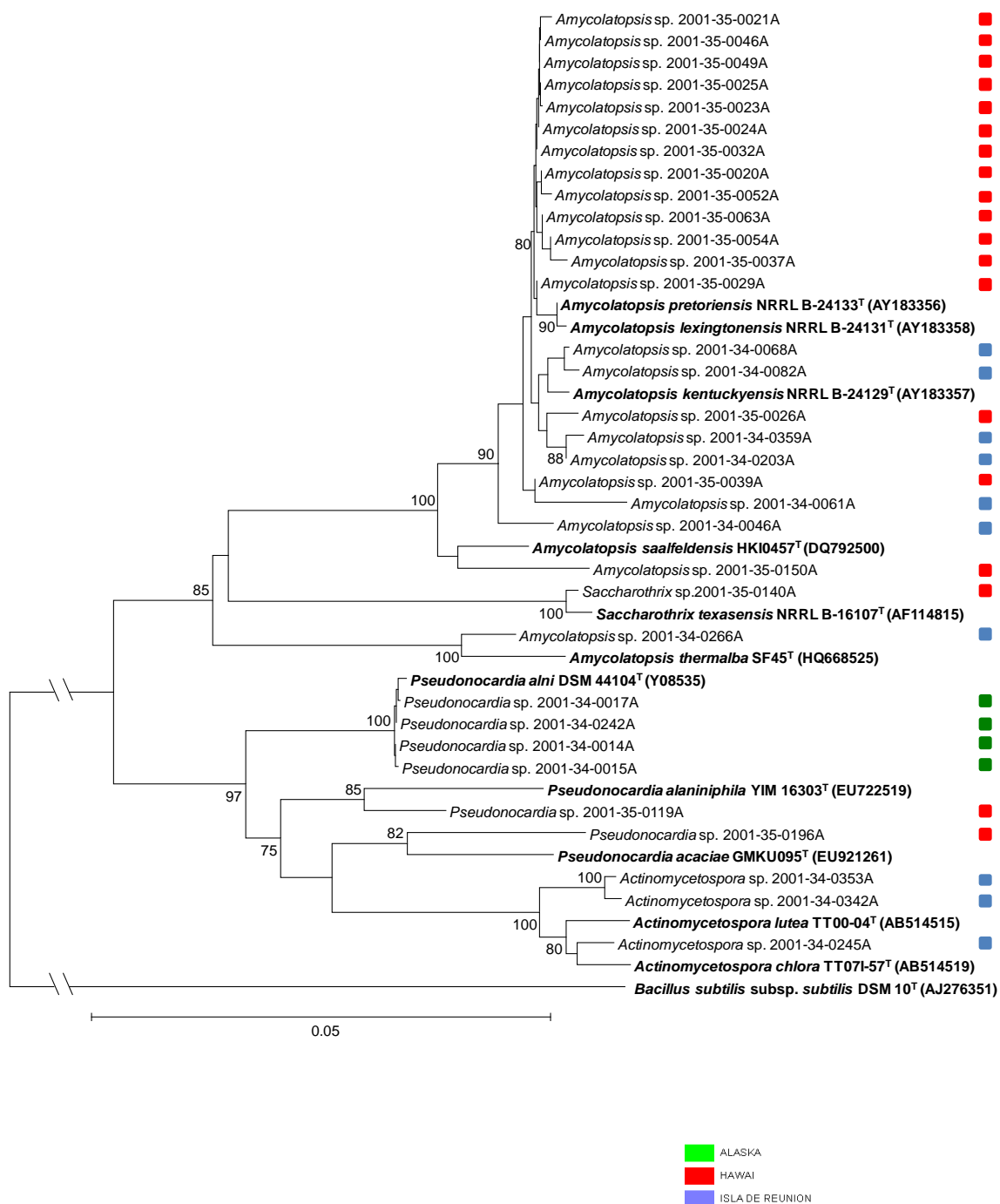
Como hemos visto, en el caso de las cepas la familia *Micromonosporaceae* también observamos numerosas ramas formadas por cepas asignadas a la misma especie y procedentes del mismo origen.

Figura 8b: Árbol filogenético de las 71 cepas de la familia *Micromonosporaceae* y de las 12 cepas tipo incluidas en el estudio, obtenido mediante el método de NJ basado en las secuencias parciales del gen 16S ARNr. El número de la barra se corresponde con el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o mayores al 75% como porcentaje de 1000 pseudorréplicas (página 121).



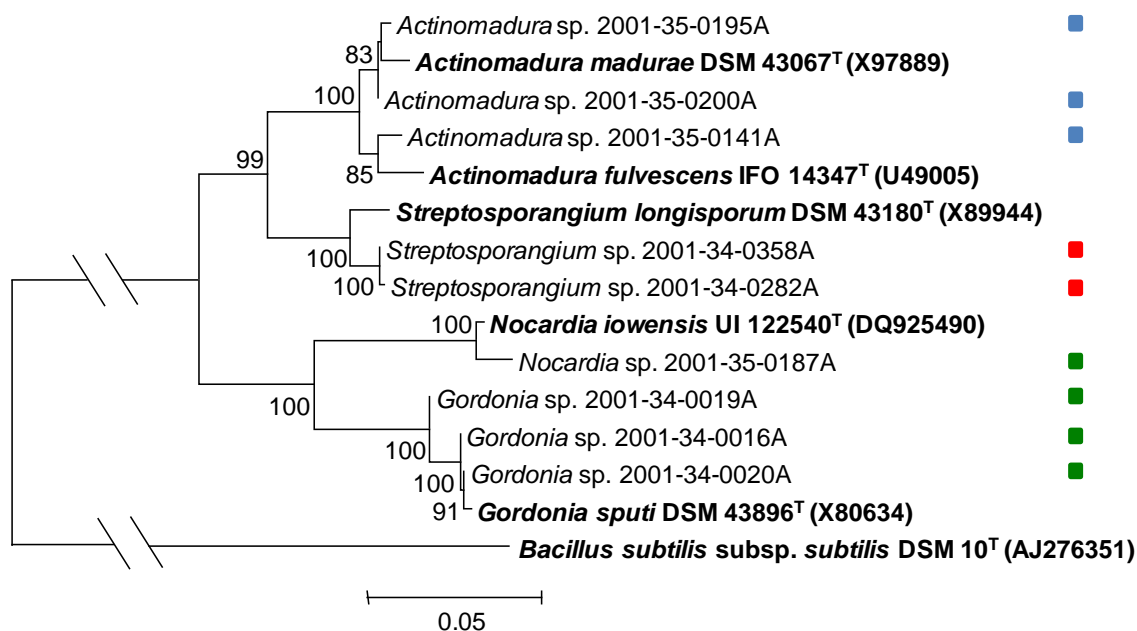
En el árbol filogenético de las cepas de la familia *Pseudonocardiaceae* (**Figura 8c**), tenemos una primera gran rama formada por 13 cepas aisladas de Hawai asociadas a las cepas tipo *Amycolatopsis pretoriensis* NRRL B-24133^T y *Amycolatopsis lexingtonensis* NRRL B-24131^T. A continuación encontramos otro clado formado por 5 cepas, 4 de Reunión y una de Hawai, que se unen con la cepa tipo *Amycolatopsis kentuckyensis* NRRL B-24129^T. A mayor distancia de las ramas anteriores, tenemos 3 clados, dos con cepas de Hawai y uno con una cepa de Reunión, que se asocian, repectivamente, con las cepas tipo *Amycolatopsis saalfeldensis* HKI0457^T, *Saccharothrix texasensis* NRRL B-16107^T y *Amycolatopsis thermalba* SF45^T. En un gran clado, separado a mayor distancia de las ramas formadas por las cepas de *Amycolatopsis* y *Saccharothrix*, encontramos las cepas asociadas a los géneros *Pseudonocardia* y *Actinomyces*. Por un lado, tenemos el clado formado por 4 cepas procedentes de Alaska y asociadas a la cepa tipo *Pseudonocardia alni* DSM 44104^T, seguido por dos ramas que contiene cada una dos cepas de Hawai que se asocian, respectivamente, a las cepas tipo *Pseudonocardia alaniniphila* YIM 16303^T y *Pseudonocardia acaciae* GMKU095^T. Por último, tenemos un clado formado por 3 cepas de Reunión que se asocian, por un lado a la cepa tipo *Actinomyces lutea* TT00-04^T y por otro a *Actinomyces chlora* TT071-57^T.

Figura 8c: Árbol filogenético de las 33 cepas de la familia *Pseudonocardiaceae* y de las 11 cepas tipo incluidas en el estudio obtenido mediante el método de NJ basado en las secuencias parciales del gen 16S ARNr. El número de la barra se corresponde con el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o mayores al 75% como porcentaje de 1000 pseudorréplicas.



En el árbol filogenético de la **Figura 8d** vemos una rama formada por 3 cepas de Hawai que se asocian a las cepas tipo *Actinomadura madurae* DSM 43067^T y *Actinomadura fulvescens* IFO 14347^T, un clado formado por 2 cepas de Reunión unidas a la cepa tipo *Streptosporangium longisporum* DSM 43180^T. En una gran rama muy alejada de las dos anteriores, tenemos un clado con una cepa de Alaska que se une a la cepa tipo *Nocardia iowensis* UI 122540^T y otra rama con 3 cepas de Alaska que se asocian con la cepa tipo *Gordonia sputi* DSM 43896^T.

Figura 8d: Árbol filogenético de las 9 cepas de las familias *Nocardiaceae* (4), *Thermomonosporaceae* (3) y *Strptosporangiaceae* (2) y de las 5 cepas tipo incluidas en el estudio obtenido mediante el método de NJ basado en las secuencias parciales del gen 16S ARNr. El número de la barra se corresponde con el número de sustituciones nucleotídicas por sitio. En los nodos se muestran los valores de *bootstrap* iguales o mayores al 75% como porcentaje de 1000 pseudorréplicas.



Con el fin de estudiar la diversidad de las cepas en base a sus secuencias nucleotídicas, estudiamos con detalle las matrices de distancias empleadas para generar cada uno de los árboles filogenéticos y agrupamos en el mismo *cluster* aquellas cepas que tenían una diferencia $\leq 1\%$, considerándose, por tanto, que eran la misma cepa o que formaban la misma OTU (Davelos *et al.*, 2004c; Baines *et al.*, 2007), con el fin de determinar cuántas OTUs distintas existen dentro de cada grupo taxonómico. El análisis filogenético realizado nos permite obtener una visión global de la diversidad de la población estudiada, a pesar de que esté basado en secuencias parciales del gen 16S ADNr.

El resultado de este análisis permitió agrupar los 222 cultivos en 76 OTUs distintas. La diversidad de las cepas, medida según el valor de N_e (cantidad media esperada para cada categoría: $N_e = N/n$ siendo N el número total de cepas y n el número de categorías) fue distinta según el taxón que consideráramos (**Tabla 18**).

Tabla 18: Diversidad de las cepas según el número de OTUs encontradas y el número de cepas asignadas a cada grupo taxonómico, así como el número promedio de cepas encontradas en cada OTU.

	OTUs	CEPAS	CEPAS/OTU (N_e)
<i>Actinomycetospora</i>	2	3	1,5
<i>Amycolatopsis</i>	6	23	3,83
<i>Pseudonocardia</i>	3	6	2
<i>Saccharothrix</i>	1	1	1
<i>Actinoplanes</i>	3	3	1
<i>Micromonospora</i>	12	67	5,58
<i>Pseudosporangium</i>	1	1	1
<i>Actinomadura</i>	3	3	1
<i>Streptosporangium</i>	1	2	2
<i>Streptomyces</i>	42	109	2,59
<i>Gordonia</i>	1	3	3
<i>Nocardia</i>	1	1	1
TOTAL	76	222	2,92

Según vemos en la **Tabla 18**, las cepas pertenecientes al género *Streptomyces* son muy diversas ya que 109 cepas se repartieron en 42 OTUs distintas, presentando un valor de N_e de 2,59. Por el contrario, la diversidad de las cepas del género *Micromonospora* es muy baja ya que las 67 cepas se repartieron en sólo 12 OTUs distintas. Esta baja diversidad entre las cepas de *Micromonospora* se debe en gran medida a las 27 cepas asignadas a la misma especie como *M. humi*, aisladas de líquenes de la isla de Reunión y agrupadas en el cluster 2 de FAMEs, aunque presentan una morfología variable. Asimismo la diversidad de las cepas del género *Amycolatopsis* también es relativamente baja puesto que las 23 cepas se repartieron en 6 OTUs, teniendo un valor de N_e de 3,83.

4.6. Caracterización de las cepas de los grupos taxonómicos mayoritarios mediante el análisis de perfiles de amplificación (*fingerprinting*).

Siguiendo nuestra aproximación polifásica y después de haber podido asignar una posición taxonómica más precisa a 222 cultivos mediante la secuenciación del gen 16S ADNr, se estudió con más detalle la diversidad de las cepas mediante distintas técnicas de PCR-fingerprinting con distinto poder de resolución para poder comparar, posteriormente, los resultados obtenidos en cada uno de los análisis realizados y poder discernir cuál de todas ellas es la que discrimina mejor las cepas de actinomicetos. En general, las técnicas de PCR-fingerprinting tienen un alto poder de resolución siendo capaces de distinguir a muy bajo nivel, diferenciando desde el nivel de especie a cepa. En nuestro caso, hemos considerado que aquellas cepas con una similitud mayor del 80% pueden considerarse la misma cepa y aquellos con un porcentaje menor son considerados cepas distintas. Como indicamos anteriormente, este punto de corte se estableció en base a nuestra propia experiencia con otros grupos de cepas y en base al trabajo de otros autores ([Sadowsky et al., 1996](#); [Davelos et al., 2004c](#); [Lannot et al., 2004](#); [Bathe et al., 2006](#)) que han utilizado este mismo punto de corte en sus estudios con cepas de *Streptomyces* utilizando la técnica de BOX-PCR o para el caso de cepas de *Micromonospora*, Alonso de la Vega (2010), estableció como punto de corte para establecer los clusters un 50% de similitud. Otros autores han empleado puntos de corte incluso mayores, hasta el 92% usando rep-PCR ([Mohapatra et al., 2007](#)).

Para poder discriminar con mayor precisión y con el fin de disminuir el “ruido” introducido cuando se analizan y se comparan todas las cepas a la vez, se separaron en grupos taxonómicos homogéneos definidos por las técnicas previamente descritas, ácidos grasos y secuenciación de tal forma que, en todos los casos de PCR-fingerprinting, se analizaron de forma independiente las cepas del género *Streptomyces* por un lado, las cepas pertenecientes a la familia *Micromonosporaceae* por otro y finalmente las de la familia *Pseudonocardiaceae*.

Para cada una de las técnicas de análisis empleadas, IGS, tADN, BOX, ERIC, REP Y (GTG)₅, se incluyeron en cada caso los cultivos estériles asociados a cada uno de los grupos taxonómicos según su morfología, su secuencia o su composición de ácidos grasos, así como los cultivos que inicialmente fueron erróneamente identificados pero que se pudieron posicionar correctamente por alguna de las técnicas previamente usadas.

La primera de las técnicas de *fingerprinting* utilizada para evaluar detalladamente la diversidad de las cepas para cada uno de los grupos taxonómicos mayoritarios, fue la de IGS-PCR que amplifica el espaciador situado entre los genes 16S y 23S ARNr. El análisis de *clusters* basado en los perfiles de amplificación se realizó con 222 cepas, 87 del género *Streptomyces* y 135 del grupo de *Micromonosporaceae*. En el caso de las cepas de la familia *Pseudonocardiaceae*, sólo pudimos obtener perfiles de amplificación de 6 cepas con estos cebadores por lo que no se realizó el análisis de *clusters* con ellos. En los dos casos estudiados, esta técnica produjo algunas bandas intensas pero en muy pequeño

número, en muchos casos con una sola banda o con una banda muy intensa junto con otras pocas bandas de menor intensidad. Además, el rango de bandas, aunque siendo mayor que en ARNt-PCR, fue menor que en rep-PCR variando entre 0,3-0,4 kb y 1.5 kb.

La segunda de las técnicas de PCR-*fingerprinting* utilizada fue la de tADN-PCR. El análisis de *clusters* basado en los perfiles de amplificación se realizó con 240 cepas de los 3 grupos taxonómicos mayoritarios. En los tres casos, esta técnica produjo unos patrones de amplificación bastante buenos pero con un número pequeño de bandas en comparación con cualquiera de las técnicas de rep-PCR y también con tamaños de bandas más pequeños, que variaban desde menos de 0,05 kb hasta aproximadamente 0,5 kb en el caso de las *Micromonosporaceae* y sólo 0,5 en el caso de las *Pseudonocardia* y de los *Streptomyces*.

La primera de las técnicas de rep-PCR utilizadas para evaluar detalladamente la diversidad de las cepas para cada uno de los grupos taxonómicos mayoritarios, fue la de BOX-PCR. El análisis de *clusters* se realizó con 298 cepas de los 3 grupos taxonómicos estudiados. En los tres casos, el cebador BOXA1R produjo unos patrones de amplificación de muy alta resolución con tamaños de bandas que variaban desde menos de 0,2 kb hasta aproximadamente 2,0 kb.

La segunda de las técnicas de rep-PCR utilizada fue la de ERIC-PCR. El análisis de *clusters* se realizó con 294 cepas de los 3 grupos taxonómicos mayoritarios. En los tres casos, se obtuvieron unos patrones de amplificación, en general con buena resolución, aunque menor que en el caso de BOX-PCR y con tamaños de bandas con un amplio rango, desde menos de 0,1 kb hasta aproximadamente 2,0 kb.

Otra de las técnicas de PCR-*fingerprinting* empleada fue la de REP-PCR. El análisis de *clusters* se realizó con 265 cepas de los 3 grandes grupos taxonómicos. En los tres casos, se obtuvieron unos patrones de amplificación con muy buena resolución, siendo en el caso de las *Micromonosporaceae* comparable a las dos técnicas de rep-PCR anteriores, bastante buena en el caso de las *Pseudonocardia* aunque con un número de bandas menor en varios casos y no tan buena en el caso de los *Streptomyces*, con una calidad claramente inferior a los casos de rep-PCR anteriores. En todos los casos, los tamaños de las bandas presentaban un amplio rango, variando desde menos de 0,05 kb hasta aproximadamente 1,5-2,0 kb.

La última técnica de PCR-*fingerprinting* utilizada fue la de (GTG)₅-PCR. El análisis de *clusters* se realizó con 279 cepas, como en los casos anteriores, de los 3 grupos mayoritarios. En los tres casos, se obtuvieron unos patrones de amplificación con buena resolución, siendo en el caso de las *Micromonosporaceae*, comparable a las dos técnicas primeras, bastante buena en el caso de las *Pseudonocardia* y no tan buena en el caso de los *Streptomyces*, con una intensidad de bandas menor que en los otros dos grupos. En todos los casos, los tamaños de las bandas presentaban un amplio rango, variando desde menos de 0,25-0,35 kb hasta aproximadamente 2,0 kb.

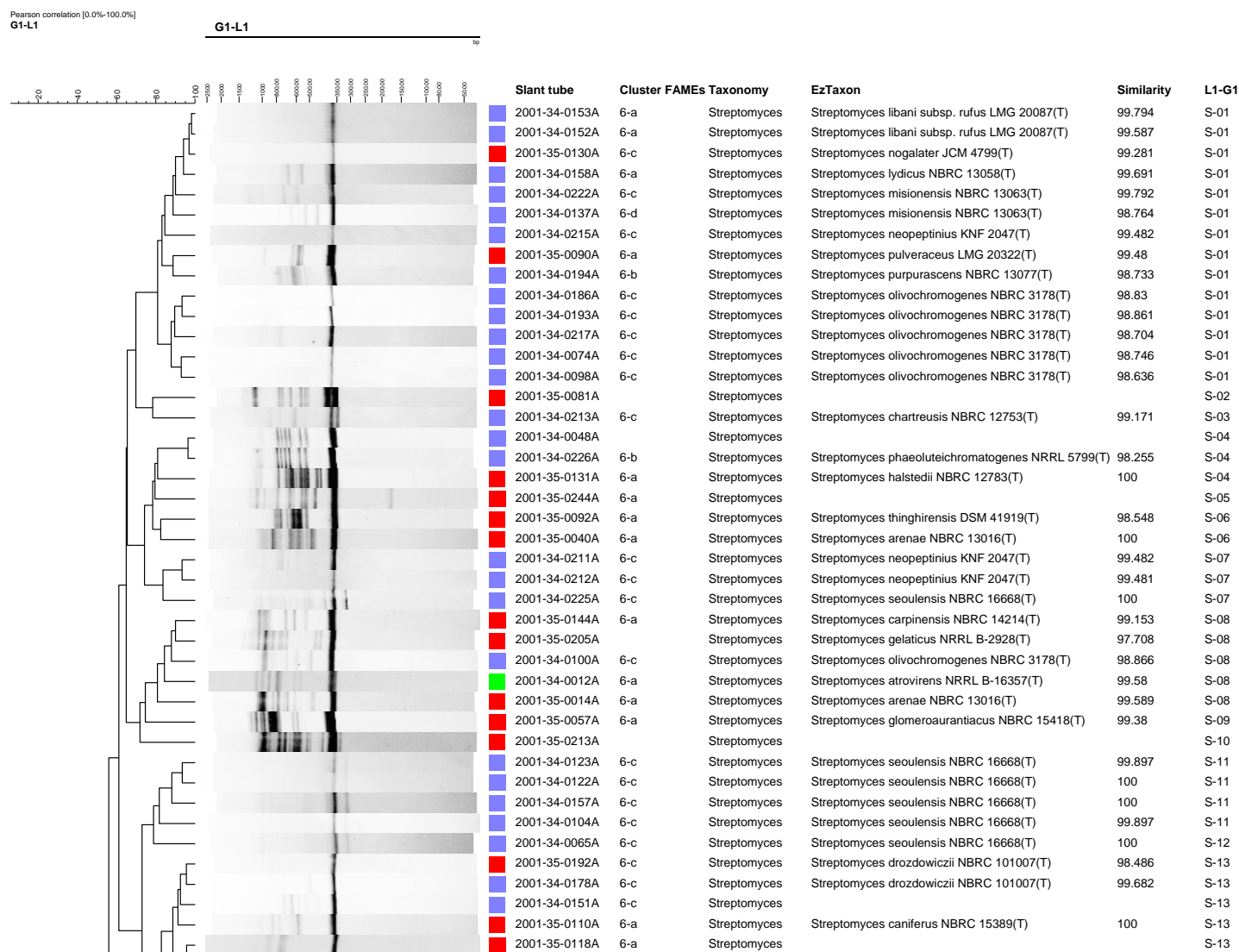
4.6.1. Caracterización de cepas del género *Streptomyces*.

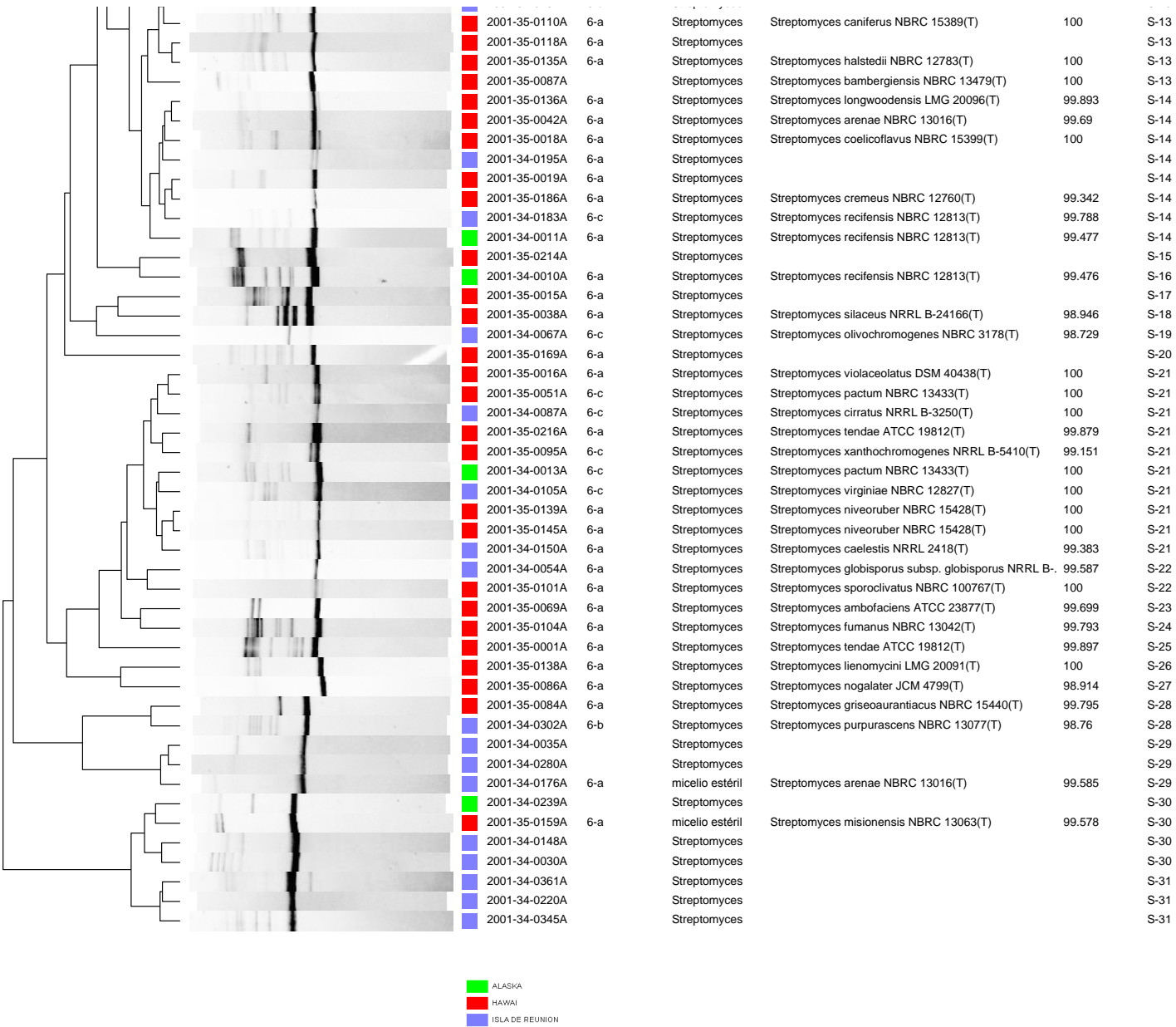
4.6.1.1. Amplificación de la región intergénica 16S-23S (IGS-PCR).

Sólo 87 cepas del género *Streptomyces* pudieron analizarse con esta técnica, distribuyéndose en sólo 31 *clusters* (Figura 9). De los 31 *clusters*, 17 eran únicos con una sola cepa. Los 14 *clusters* restantes, contienen 70 cepas, variando el número de cepas desde 2 hasta 14.

Pocas conclusiones pueden sacarse en cuanto al origen de las cepas o a la taxonomía de las cepas que los integran, ya que los *clusters* son muy heterogéneos en ambos sentidos. El único caso de cepas asignadas a la misma identificación y que se agrupan juntas es el de 5 de las 9 cepas identificadas como *S. seoulensis*, que se encuentran en los *clusters* 11 y 12.

Figura 9: Dendrograma de las cepas de *Streptomyces* resultante del análisis de IGS 16S-23S.





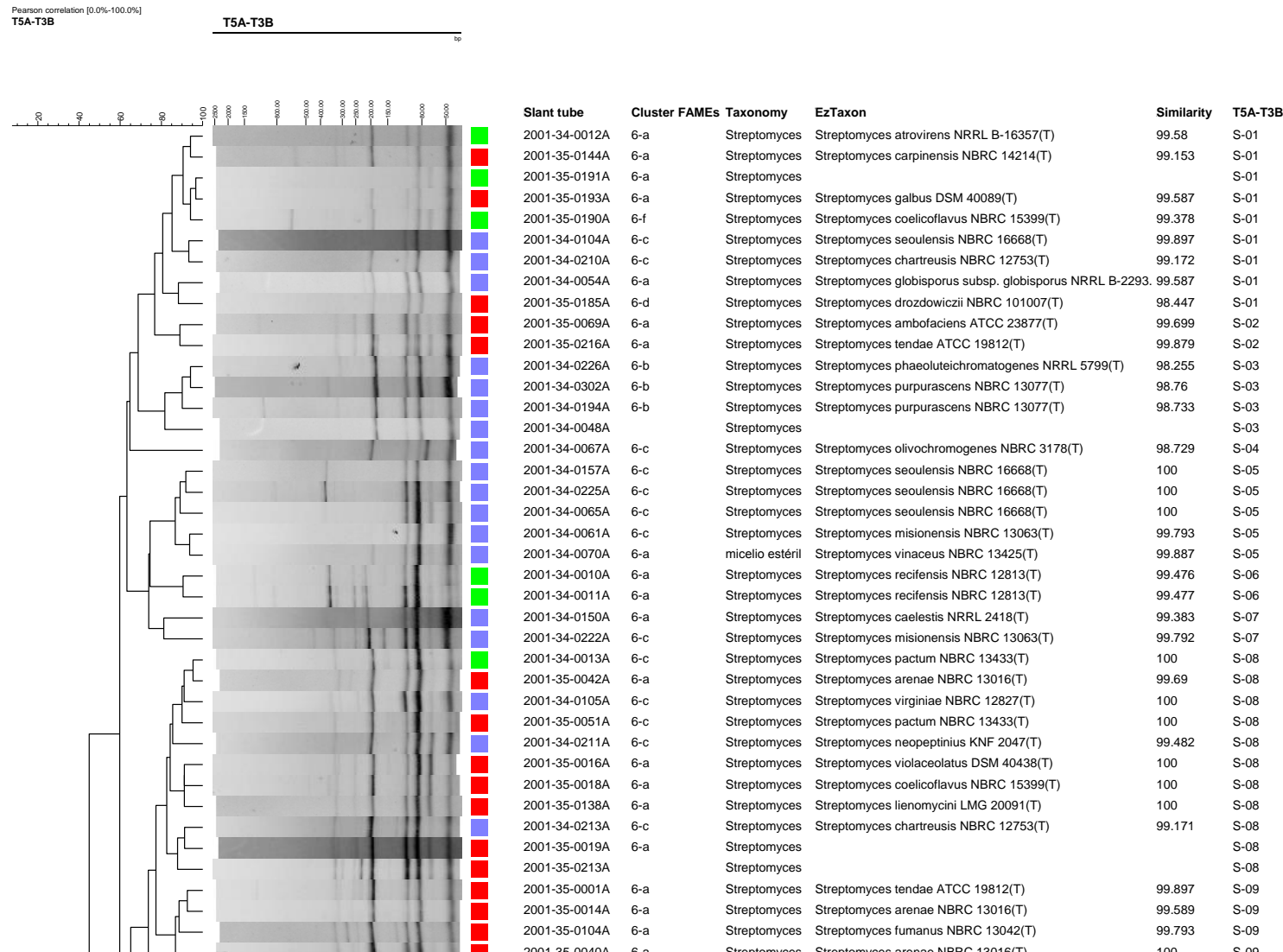
4.6.1.2. tADN-PCR.

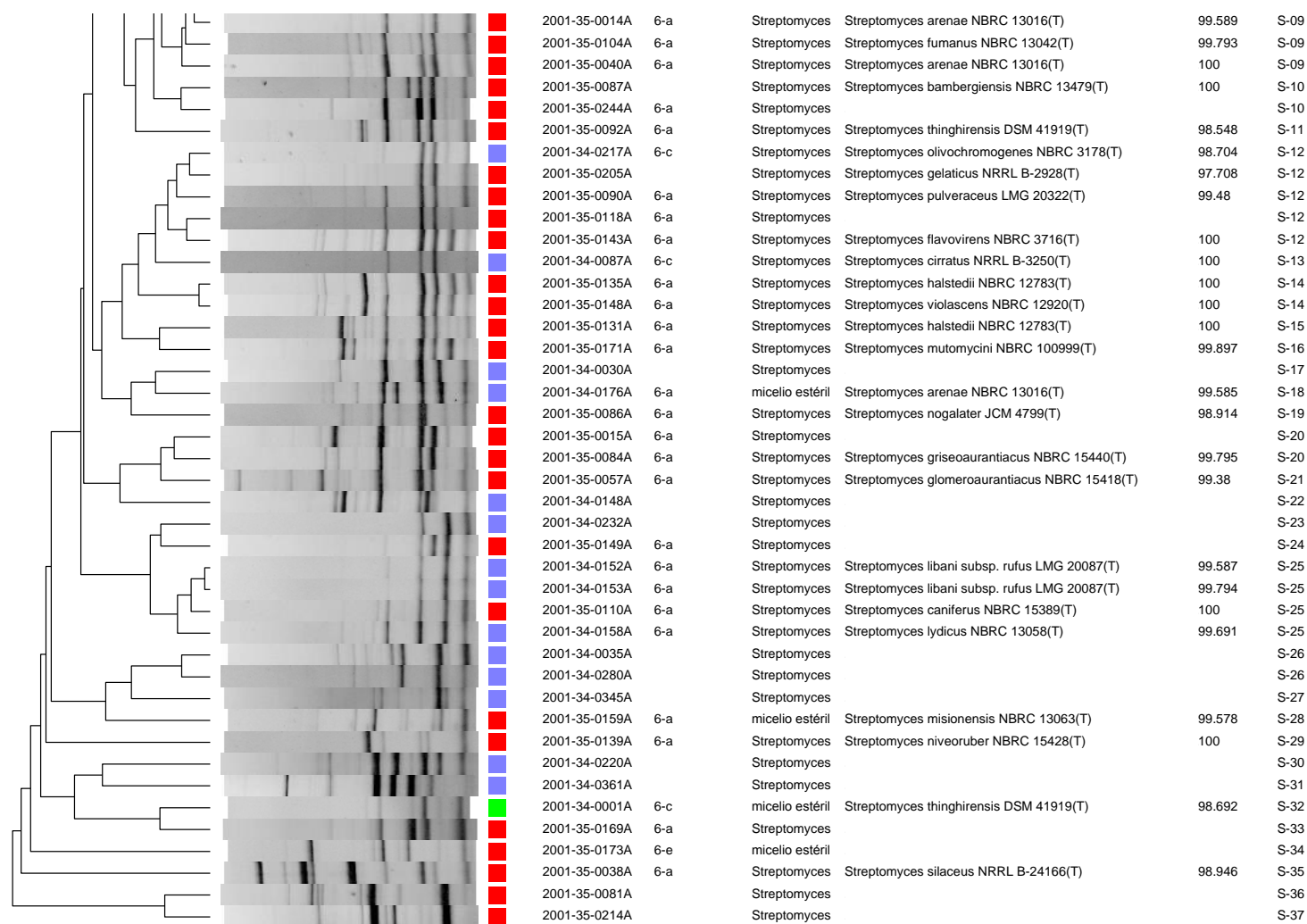
Sólo 79 cepas del género *Streptomyces* pudieron analizarse con esta técnica, distribuyéndose en sólo 37 *clusters*, número que es, como veremos más adelante, significativamente inferior a los *clusters* generados con otras técnicas (**Figura 10**). El bajo número de bandas y el escaso rango de tamaños generado con este análisis conlleva la formación de un menor número de *clusters*. En el caso de los *Streptomyces*, de los 37 *clusters*, 23 eran únicos con una sola cepa. De los 14 *clusters* restantes, el número de cepas que contienen varía de dos hasta 11.

Pocos casos de cepas asignadas a la misma identificación y agrupadas en el mismo *cluster* podemos encontrar. Podemos ver 3 cepas identificadas como *S. seoulensis* aisladas de Reunión agrupadas en el *cluster* 5, junto con otras dos cepas. También tenemos el caso de las dos cepas de *S. recifensis* aisladas de Alaska en el *cluster* 6.

Como en el caso de la técnica anterior, tampoco con ésta se observa una tendencia de las cepas a agruparse según su origen, puesto que podemos ver numerosos *clusters* con cepas de diversos orígenes, aunque hay algunos casos en los que sí que se mantiene la homogeneidad en cuanto al origen como son los *clusters* 3 y 5, con cepas de Reunión o los *clusters* 9, 10, 14 y 20 con cultivos de Hawai, o las dos cepas de Alaska que forman en el *cluster* 6, mencionado anteriormente.

Figura 10: Dendrograma de las cepas de *Streptomyces* resultante del análisis de tADN-PCR.



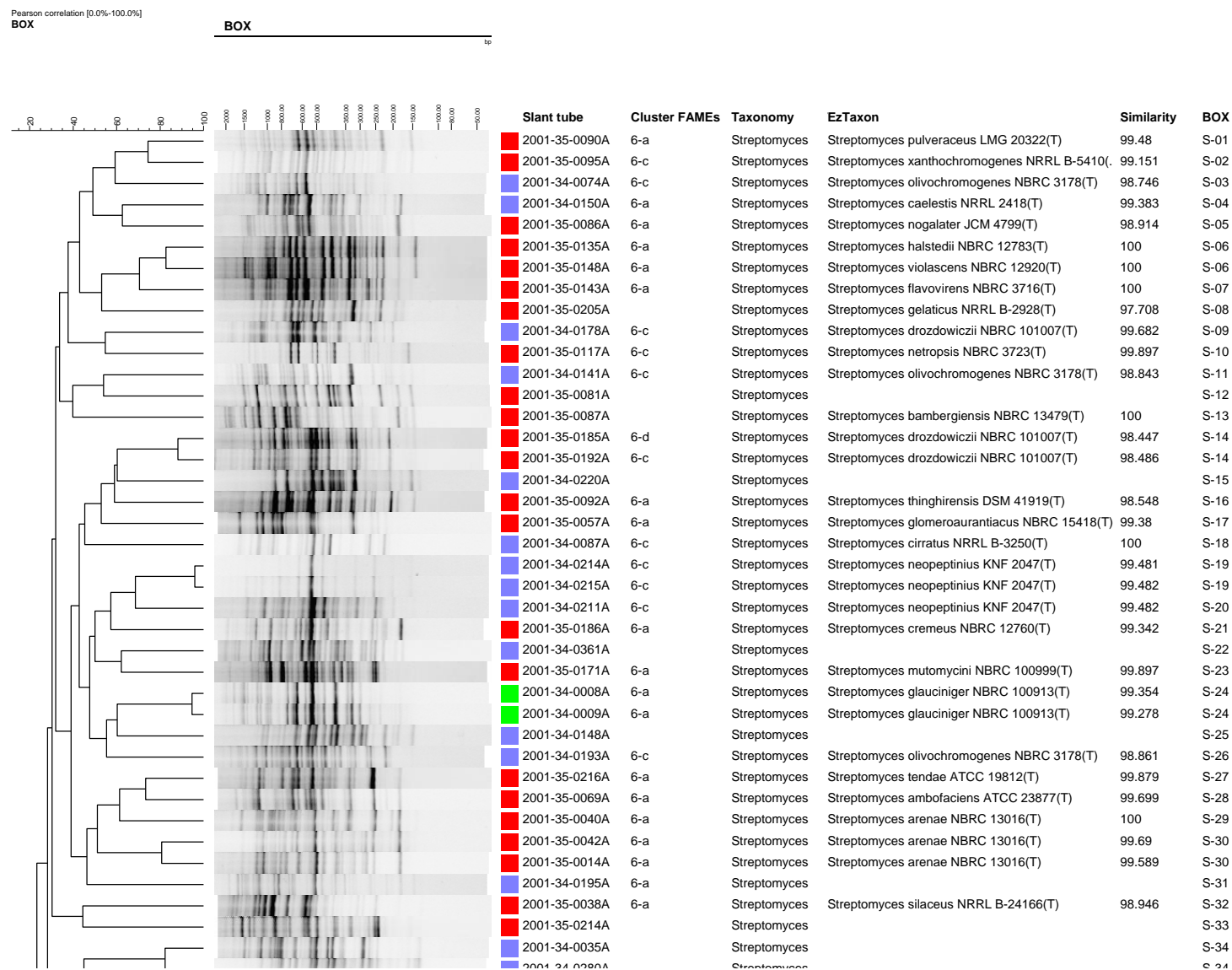


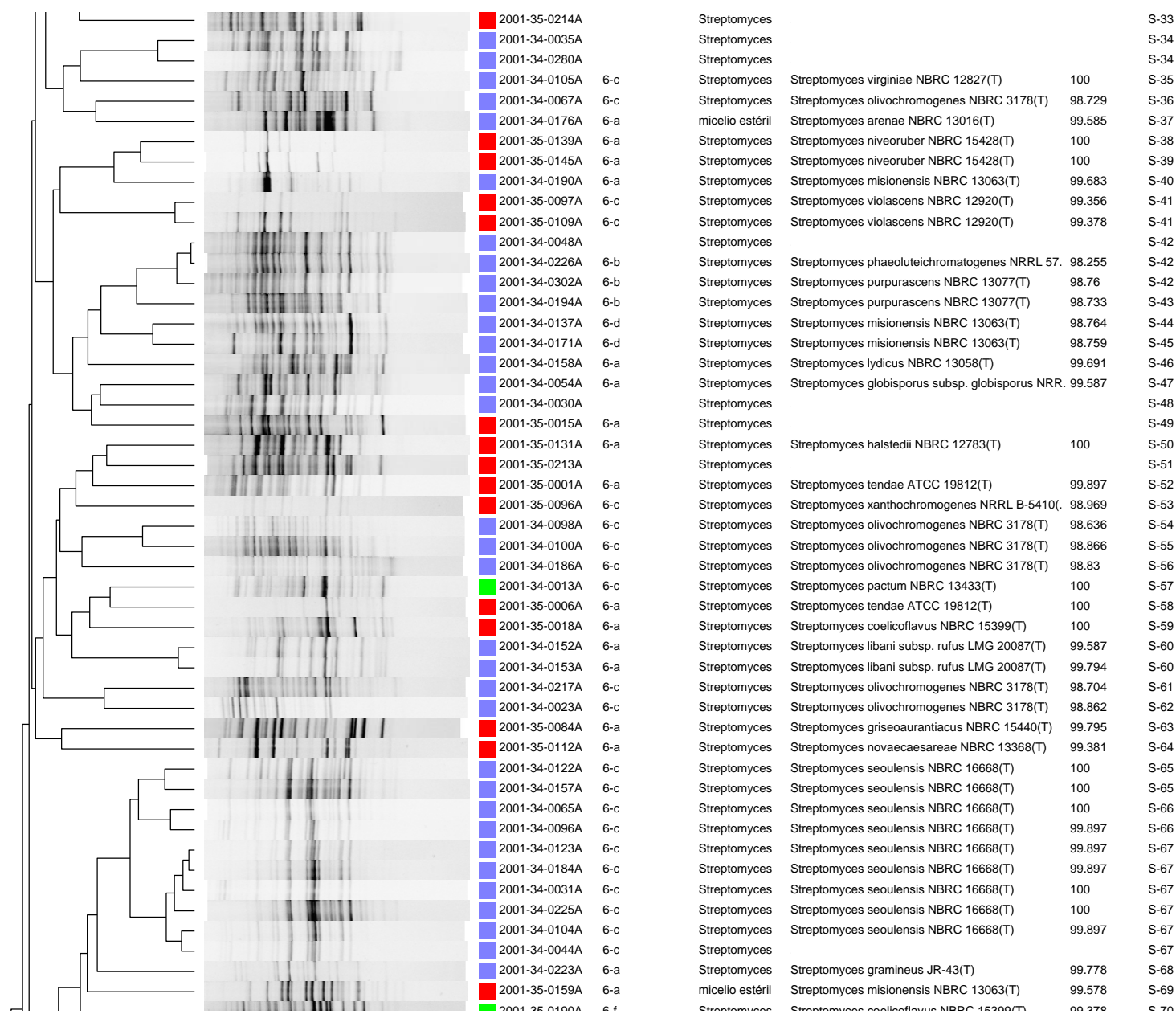
■ ALASKA
■ HAWAI
■ ISLA DE REUNION

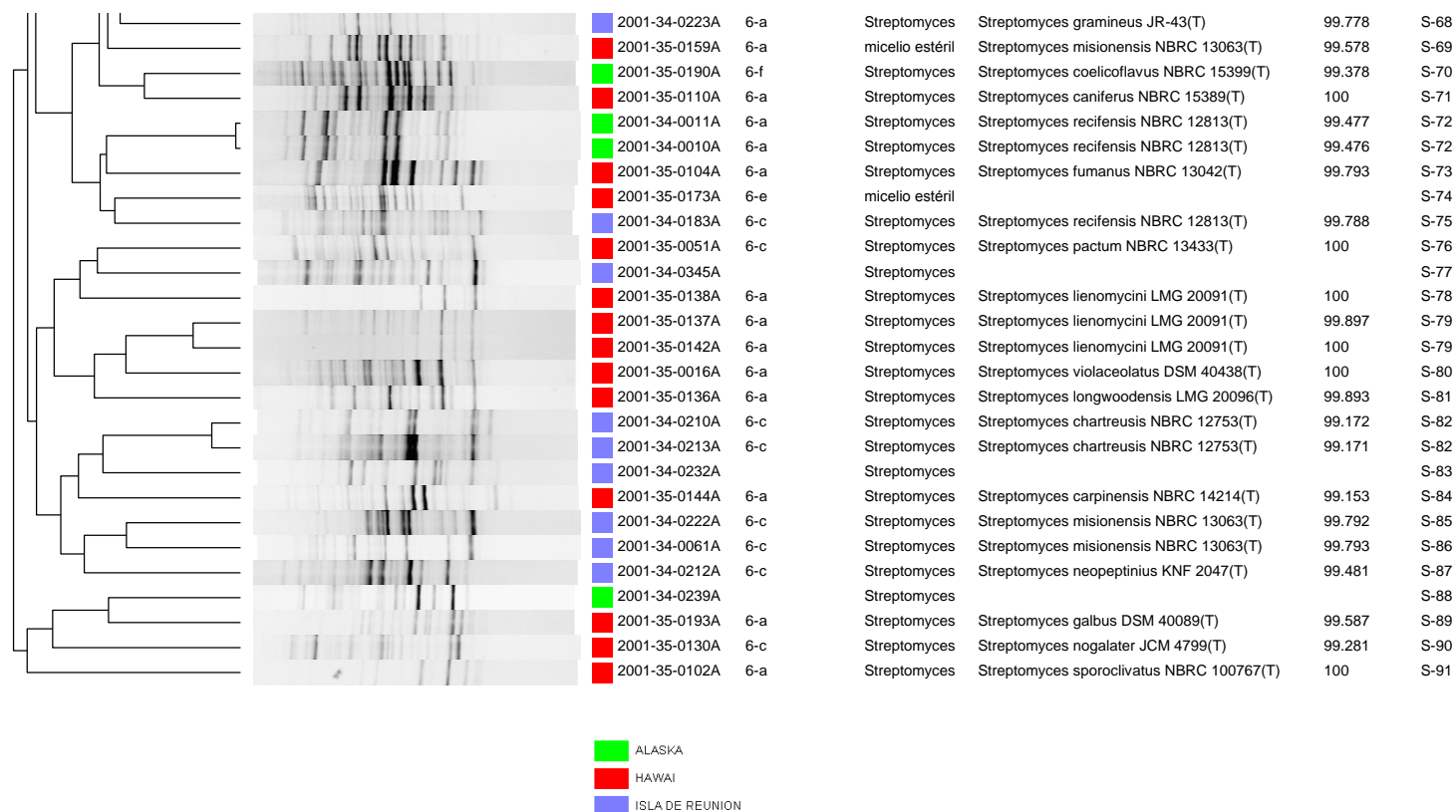
4.6.1.3. rep-PCR.

a.- BOX-PCR

Las 111 cepas asignadas al género *Streptomyces* se agruparon en 91 *clusters* definidos a un punto de corte del 80% de similitud (**Figura 11**), dando esto idea de la gran diversidad de estas cepas, ya que 76 *clusters* eran únicos con un solo cultivo y 13 de los 15 *clusters* restantes contenían sólo 2 cepas. De los otros 2 *clusters*, 1 de ellos (*cluster* 42) contenía 3 cepas y el otro (*cluster* 67) era el mayor con 6 cepas. Este último *cluster* forma un *cluster* mayor junto los *clusters* 65 y 66, estando el conjunto integrado por 10 cultivos, 9 de los cuales se identificaron como *Streptomyces seoulensis*. Estas 10 cepas se aislaron de líquenes de Reunión y todas ellas se encontraban en el *cluster* 6-c del análisis de FAMES. Todos los *clusters* con más de una cepa estaban formados por cultivos del mismo origen, y en todos los casos, salvo los *clusters* 6 y 42, las cepas tenían la misma clasificación según su secuencia. Entre las cepas de Alaska, con la misma taxonomía y que se agrupan en el mismo *cluster* tenemos el *cluster* 24 formado por dos cepas de *S. glauciniger* el *cluster* 72 con dos cepas de *S. recifensis*. Entre las cepas procedentes de Hawai, tenemos el *cluster* 14 formado por dos cepas de *S. drozdowiczii*; los *clusters* 29 y 30 con tres cepas de *S. arenae*; el *cluster* 41 está formado por dos cepas de *S. violascens* y los *clusters* 78 y 79 con tres cepas de *S. lienomycini*. Y entre las cepas procedentes de Reunión, tenemos los *clusters* 19 y 20 con tres cultivos de *S. neopectinius*; el *cluster* 60 con dos cepas de *S. libani* subsp. *rufus*; los *clusters* 65, 66 y 67 integrados por 9 cepas de *S. seoulensis* y el *cluster* 82 con dos cepas de *S. chartreusis*.

Figura 11: Dendrograma de las cepas de *Streptomyces* resultante del análisis de BOX-PCR.

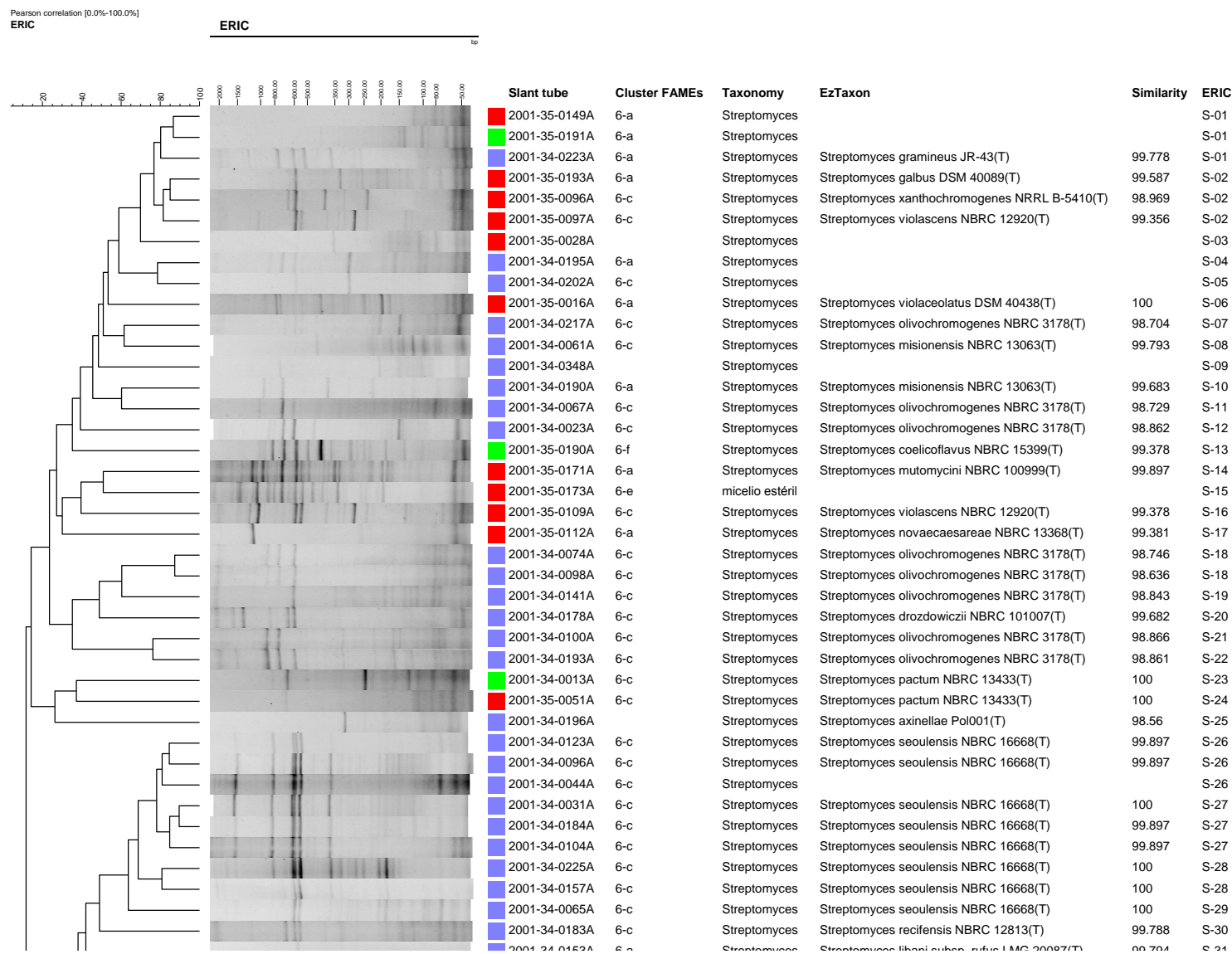


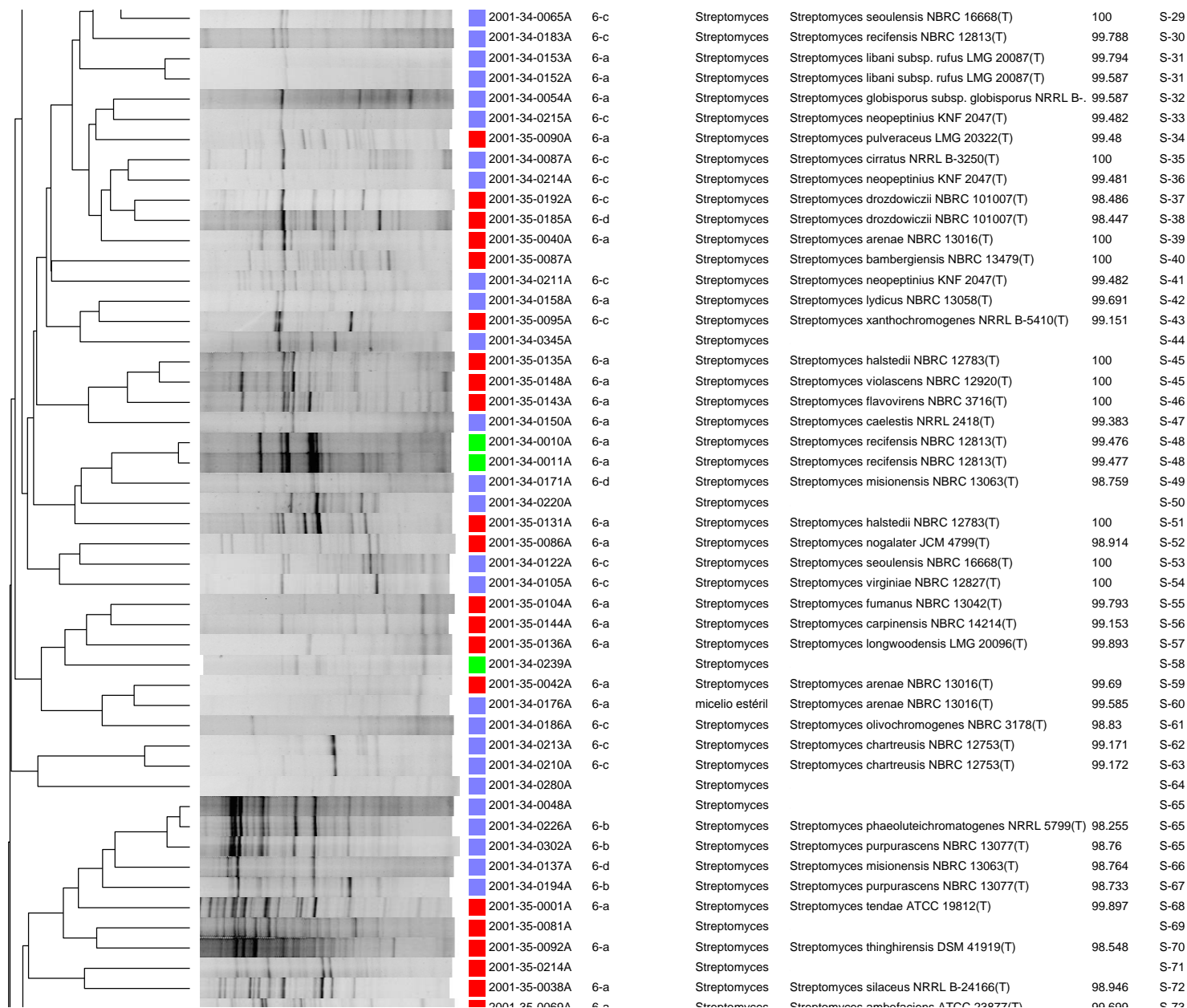


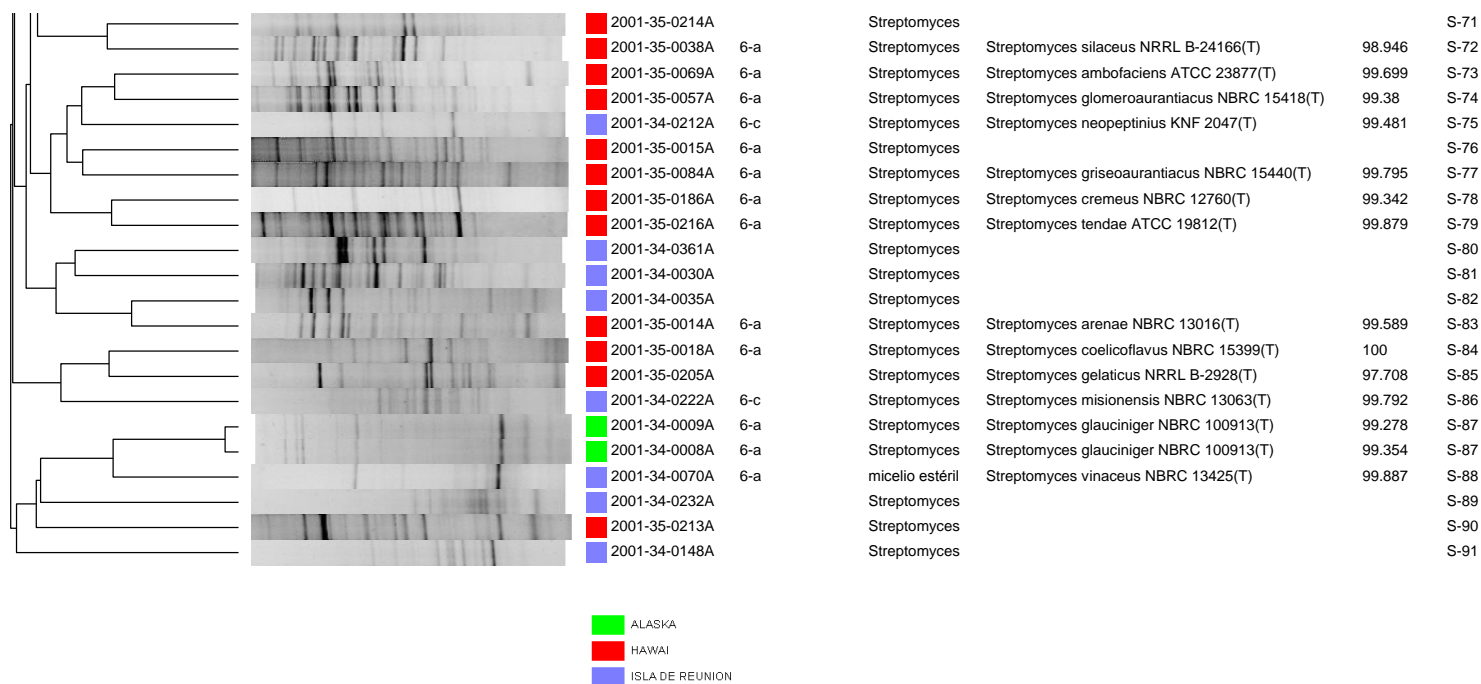
b.- ERIC-PCR.

Las 107 cepas del género *Streptomyces* analizadas se agruparon también, como en el caso de BOX-PCR, en 91 *clusters* definidos a un punto de corte del 80% de similitud (**Figura 12**), dando esto idea una vez más de la gran diversidad de estos cultivos, ya que 80 *clusters* eran únicos con una sola cepa. De los 11 *clusters* restantes, 6 contenían sólo 2 cepas y los otros 5 tenían 3 cepas cada uno. Como también ocurría en BOX-PCR, los *clusters* 26 al 29 forman un *cluster* mayor integrado por 9 cultivos, 8 de los cuales se identificaron como *Streptomyces seoulensis*. Estas 9 cepas se aislaron de líquenes de Reunión y todas ellas se encontraban en el *cluster* 6-c del análisis de FAMEs. Además, nos volvemos a encontrar con las dos cepas de *S. recifensis* que fueron aisladas de Alaska y que se encuentran en el *cluster* 6-a de FAMEs, que se agrupan en el *cluster* 48. Los *clusters* con más de una cepa estaban formados por cepas aisladas del mismo origen, salvo el caso del *cluster* 1, con 3 cepas cada uno de un origen distinto.

Otras cepas de Alaska, con la misma taxonomía y que se agrupan en el mismo *cluster* son las dos cepas de *S. glauciniger* en el *cluster* 87. En la misma situación, pero con cepas procedentes de Reunión, tenemos los *clusters* 18 y 19 con tres cepas de *S. olivochromogenes*; el *cluster* 31 con dos cepas de *S. libani* subsp. *rufus*.

Figura 12: Dendrograma de las cepas de *Streptomyces* resultante del análisis de ERIC-PCR.



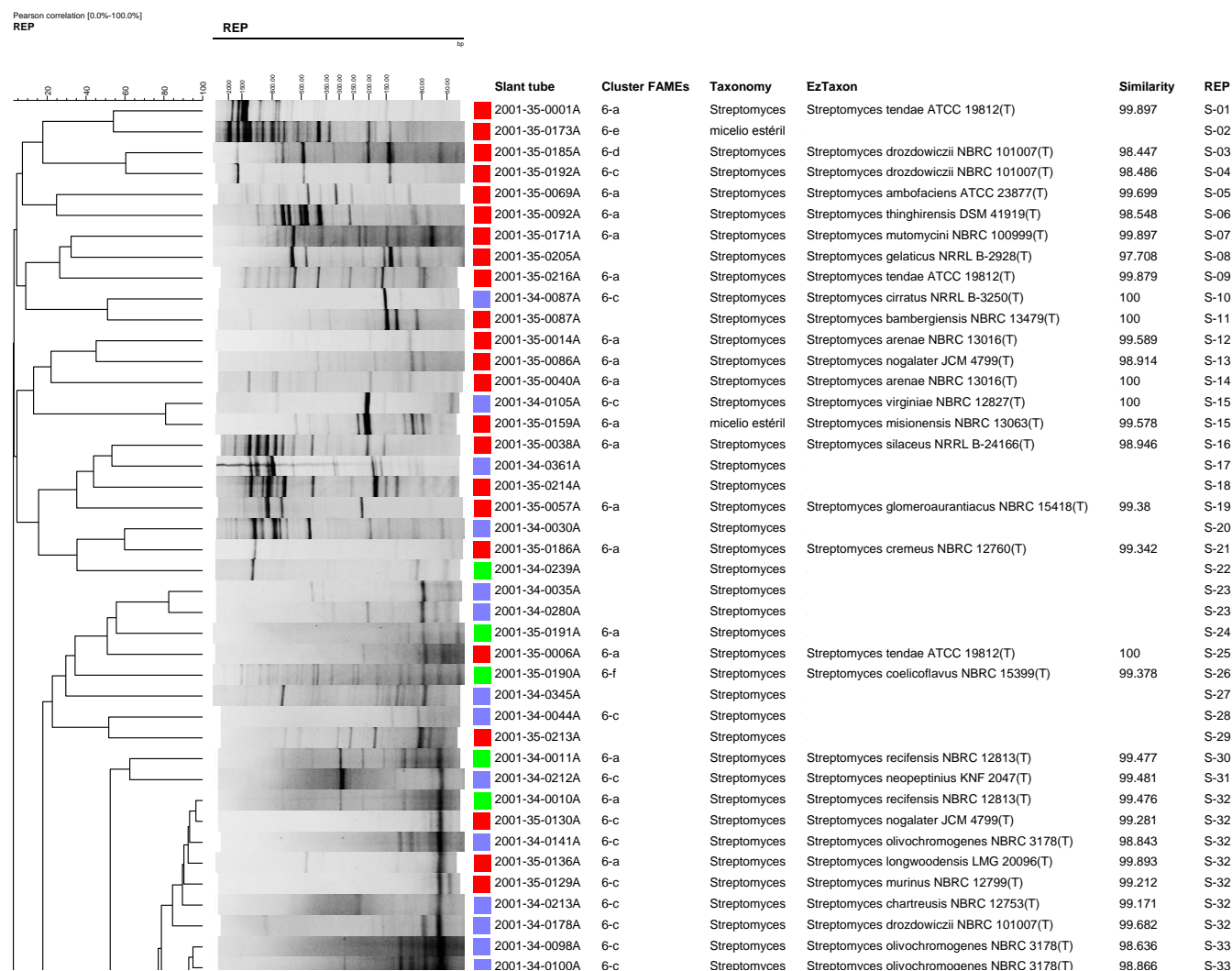


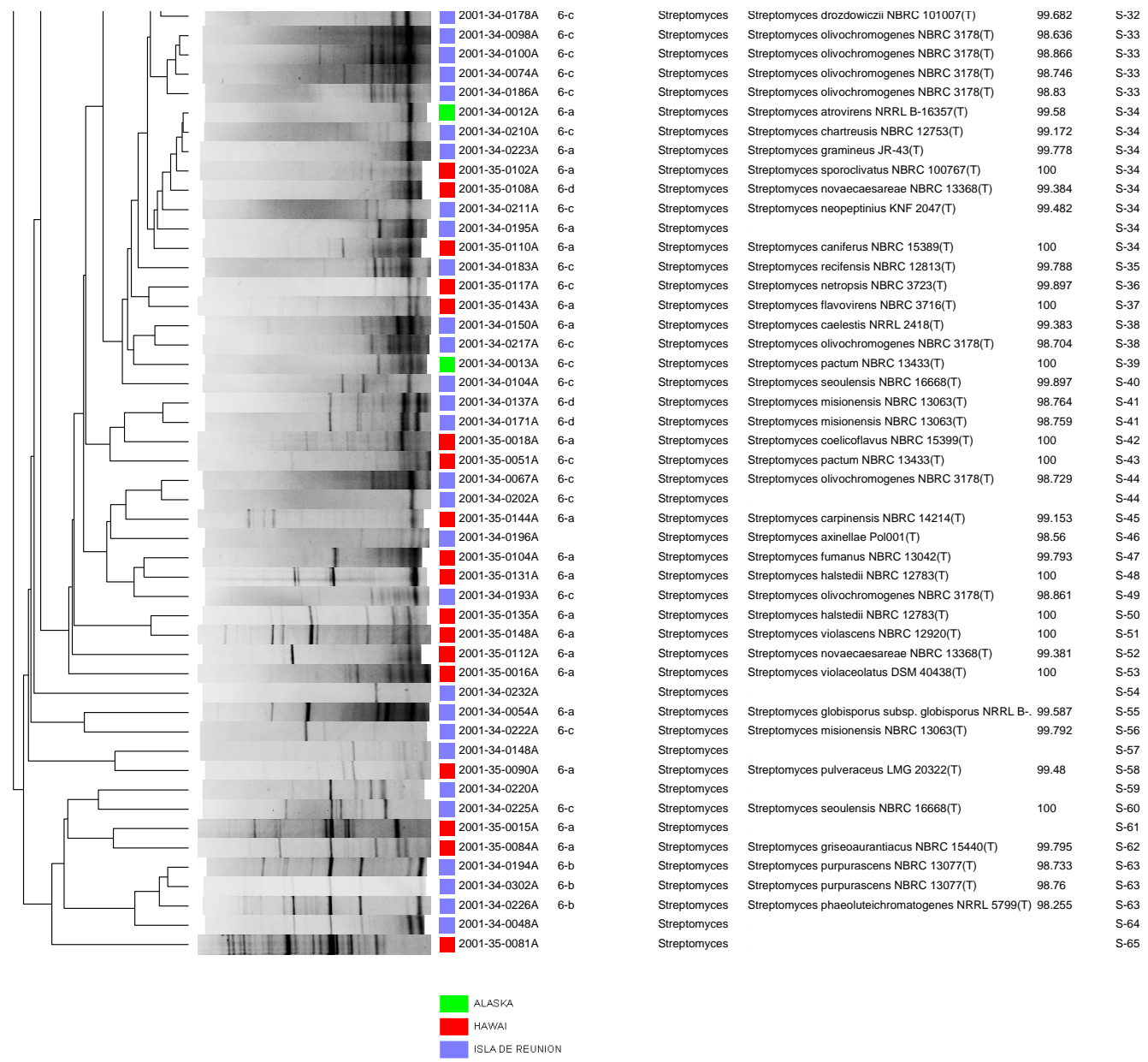
c.- REP-PCR.

En el caso de las cepas del género *Streptomyces*, los patrones de amplificación tenían muy baja resolución con bandas borrosas y poco claras. Además, sólo 88 cultivos pudieron analizarse mediante REP-PCR y en consecuencia, el número de *clusters* que se generaron fue también significativamente menor, aunque manteniendo la alta diversidad observada con las otras técnicas. En este caso las 88 cepas se repartieron entre 65 *clusters*, definidos también a un punto de corte del 80% de similitud (**Figura 13**), de los cuales 56 eran *clusters* únicos con un solo cultivo. De los 9 *clusters* restantes, 5 contenían sólo 2 cepas y los otros 4 tenían entre 3 y 8 cepas.

En este caso, debido a la baja resolución de los patrones de amplificación, no encontramos los grandes *clusters* formados con las otras técnicas y lo que se observa es que los *clusters* con más de una cepa no son homogéneos en cuanto a la identidad de las cepas que los integran, encontrando diversas taxonomías dentro del mismo cluster. Por otro lado, en algunos casos, tampoco existe homogeneidad de los clusters en cuanto al origen, encontrándonos dentro del mismo cluster cepas con distinta procedencia. Así, en el caso de las 11 cepas de *Streptomyces seoulensis* que se agrupaban en un gran *cluster* con las dos técnicas anteriores, sólo se han podido analizar 5 de ellas con REP-PCR, encontrándose cada una de ellas en un cluster distinto. Sin embargo, sí que encontramos dos casos de cepas con la misma taxonomía y el mismo origen que se agrupan en el mismo *cluster* como son cuatro cepas de *S. olivochromogenes* aisladas de Reunión en el *cluster* 87 y dos cepas de *S. misionensis* en el *cluster* 41, también procedentes de Reunión.

Figura 13: Dendrograma de las cepas de *Streptomyces* resultante del análisis de REP-PCR.





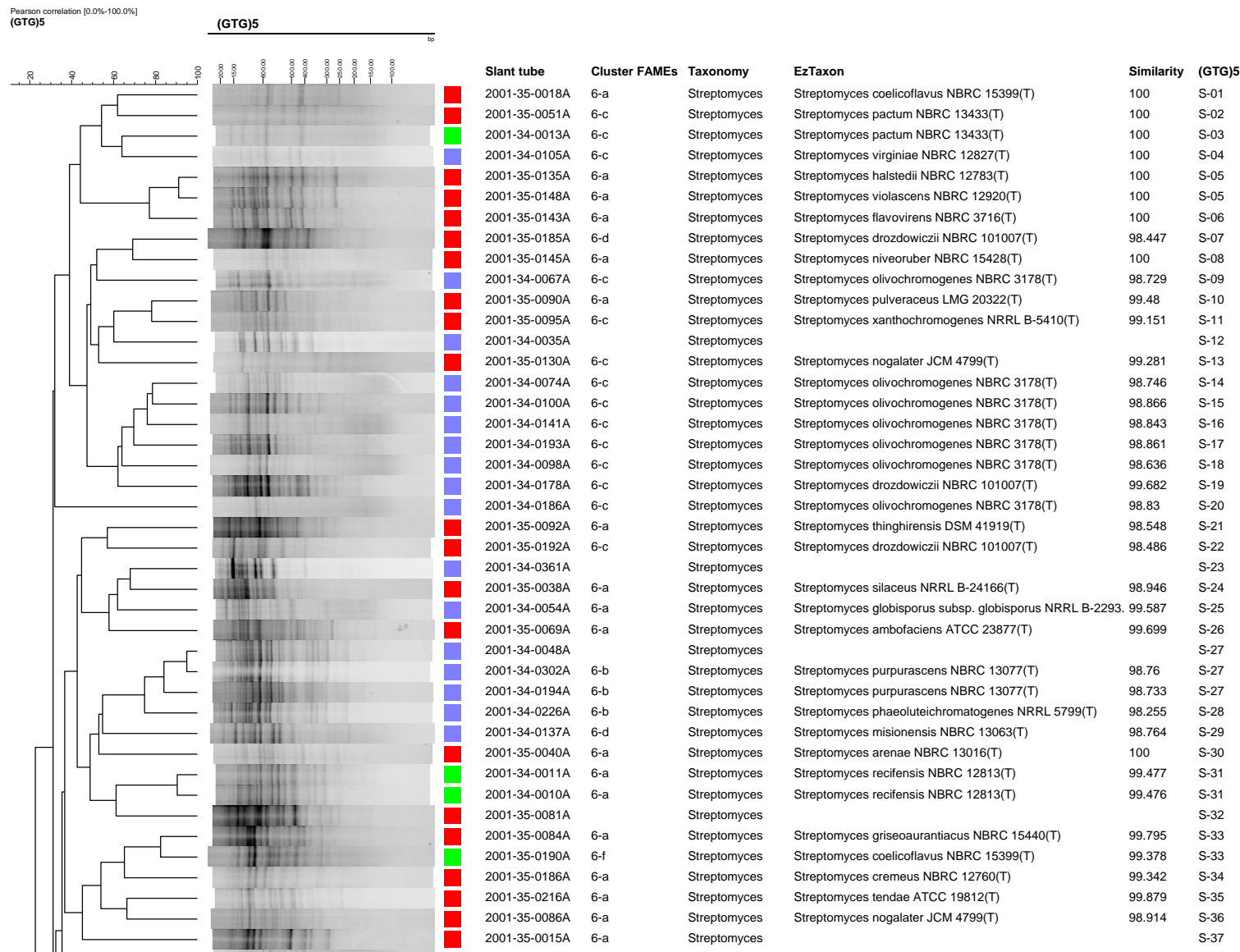
- (GTG)₅-PCR.

Las 96 cepas del género *Streptomyces* se agruparon en 89 *clusters* (Figura 14), confirmando una vez más la gran diversidad de estos cultivos, ya que 90 *clusters* eran únicos con un solo cultivo, 5 de los 6 *clusters* restantes contenían sólo 2 cepas y el último tenía tres cepas, agrupando estos seis *clusters* sólo 13 cepas.

Como viene siendo habitual con todas las técnicas empleadas, las cepas de *Streptomyces seoulensis* aisladas de Reunión e incluidas en el *cluster* 6-c de FAMEs se integran en un gran *cluster* formado por los *clusters* 77 al 82, en donde se incluyen 8 cepas de *Streptomyces seoulensis* más una novena cepa no secuenciada. Además, nos volvemos a encontrar con las dos cepas de *S. recifensis* aisladas de Alaska que se agrupan en el *cluster* 31 y entre las cepas procedentes de Reunión, los *clusters* 14 al 18 con cinco cepas de *S. olivochromogenes* y dos cepas de *S. libani* subsp. *rufus* agrupadas en el *cluster* 73.

Con respecto a los orígenes, 5 de los 6 *clusters* con más de una cepa estaban formados por cepas del mismo origen.

Figura 14: Dendrograma de las cepas de *Streptomyces* resultante del análisis de (GTG)₅-PCR.



				2001-35-0086A	6-a	Streptomyces	Streptomyces nogalater JCM 4799(T)	98.914	S-36
				2001-35-0015A	6-a	Streptomyces			S-37
				2001-35-0097A	6-c	Streptomyces	Streptomyces violascens NBRC 12920(T)	99.356	S-38
				2001-35-0109A	6-c	Streptomyces	Streptomyces violascens NBRC 12920(T)	99.378	S-39
				2001-34-0150A	6-a	Streptomyces	Streptomyces caelestis NRRL 2418(T)	99.383	S-40
				2001-35-0001A	6-a	Streptomyces	Streptomyces tendae ATCC 19812(T)	99.897	S-41
				2001-35-0144A	6-a	Streptomyces	Streptomyces carpinensis NBRC 14214(T)	99.153	S-42
				2001-35-0087A		Streptomyces	Streptomyces bambergiensis NBRC 13479(T)	100	S-43
				2001-34-0217A	6-c	Streptomyces	Streptomyces olivochromogenes NBRC 3178(T)	98.704	S-44
				2001-34-0023A	6-c	Streptomyces	Streptomyces olivochromogenes NBRC 3178(T)	98.862	S-45
				2001-34-0171A	6-d	Streptomyces	Streptomyces misionensis NBRC 13063(T)	98.759	S-46
				2001-35-0173A	6-e	micelio estéril			S-47
				2001-35-0214A		Streptomyces			S-48
				2001-35-0057A	6-a	Streptomyces	Streptomyces glomeroaurantiacus NBRC 15418(T)	99.38	S-49
				2001-35-0131A	6-a	Streptomyces	Streptomyces halstedii NBRC 12783(T)	100	S-50
				2001-35-0096A	6-c	Streptomyces	Streptomyces xanthochromogenes NRRL B-5410(T)	98.969	S-51
				2001-34-0030A		Streptomyces			S-52
				2001-34-0345A		Streptomyces			S-53
				2001-34-0195A	6-a	Streptomyces			S-54
				2001-35-0213A		Streptomyces			S-55
				2001-34-0158A	6-a	Streptomyces	Streptomyces lydicus NBRC 13058(T)	99.691	S-56
				2001-34-0232A		Streptomyces			S-57
				2001-35-0117A	6-c	Streptomyces	Streptomyces netropsis NBRC 3723(T)	99.897	S-58
				2001-35-0161A	6-c	Streptomyces	Streptomyces griseoplanus AS 4.1868(T)	100	S-59
				2001-35-0104A	6-a	Streptomyces	Streptomyces fumanus NBRC 13042(T)	99.793	S-60
				2001-34-0239A		Streptomyces			S-61
				2001-35-0136A	6-a	Streptomyces	Streptomyces longwoodensis LMG 20096(T)	99.893	S-62
				2001-35-0137A	6-a	Streptomyces	Streptomyces lienomycinii LMG 20091(T)	99.897	S-63
				2001-35-0171A	6-a	Streptomyces	Streptomyces mutomycinii NBRC 100999(T)	99.897	S-64
				2001-34-0176A	6-a	micelio estéril	Streptomyces arenae NBRC 13016(T)	99.585	S-65
				2001-34-0211A	6-c	Streptomyces	Streptomyces neopectinius KNF 2047(T)	99.482	S-66
				2001-35-0139A	6-a	Streptomyces	Streptomyces niveoruber NBRC 15428(T)	100	S-67
				2001-34-0214A	6-c	Streptomyces	Streptomyces neopectinius KNF 2047(T)	99.481	S-68
				2001-34-0215A	6-c	Streptomyces	Streptomyces neopectinius KNF 2047(T)	99.482	S-69
				2001-35-0159A	6-a	micelio estéril	Streptomyces misionensis NBRC 13063(T)	99.578	S-70
				2001-34-0212A	6-c	Streptomyces	Streptomyces neopectinius KNF 2047(T)	99.481	S-71
				2001-34-0213A	6-c	Streptomyces	Streptomyces chartreusis NBRC 12753(T)	99.171	S-72
				2001-34-0152A	6-a	Streptomyces	Streptomyces libani subsp. rufus LMG 20087(T)	99.587	S-73
				2001-34-0153A	6-a	Streptomyces	Streptomyces libani subsp. rufus LMG 20087(T)	99.794	S-73
				2001-34-0009A	6-a	Streptomyces	Streptomyces glauciniger NBRC 100913(T)	99.278	S-74
				2001-35-0110A	6-a	Streptomyces	Streptomyces caniferus NBRC 15389(T)	100	S-75
				2001-35-0014A	6-a	Streptomyces	Streptomyces arenae NBRC 13016(T)	99.589	S-76
				2001-34-0123A	6-c	Streptomyces	Streptomyces seoulensis NBRC 16668(T)	99.897	S-77
				2001-34-0157A	6-c	Streptomyces	Streptomyces seoulensis NBRC 16668(T)	100	S-78
				2001-34-0225A	6-c	Streptomyces	Streptomyces seoulensis NBRC 16668(T)	100	S-79
				2001-34-0044A	6-c	Streptomyces			S-80
				2001-34-0184A	6-c	Streptomyces	Streptomyces seoulensis NBRC 16668(T)	99.897	S-80
				2001-34-0104A	6-c	Streptomyces	Streptomyces seoulensis NBRC 16668(T)	99.897	S-81
				2001-34-0096A	6-c	Streptomyces	Streptomyces seoulensis NBRC 16668(T)	99.897	S-82



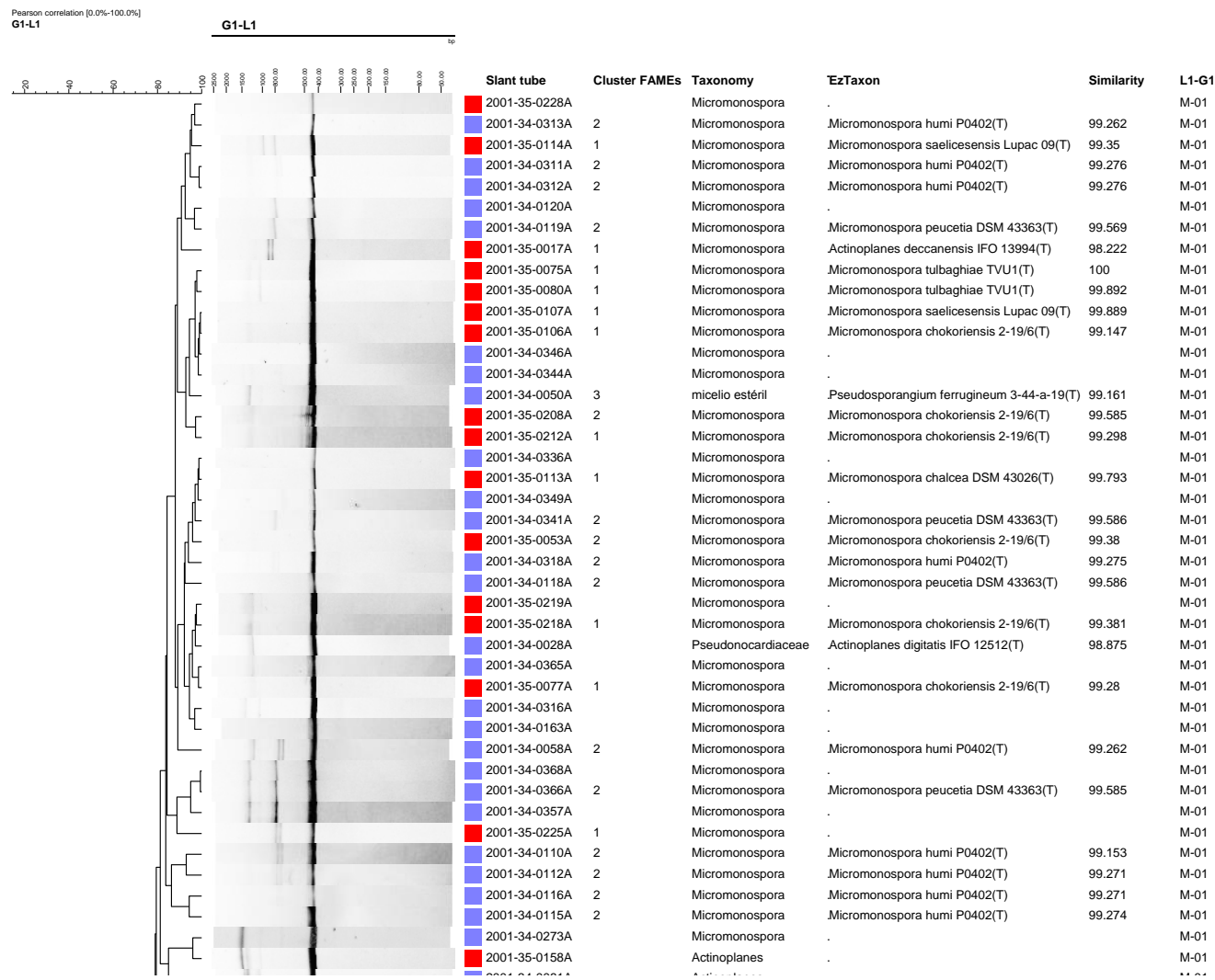
4.6.2. Caracterización de cepas de la familia *Micromonosporaceae*.

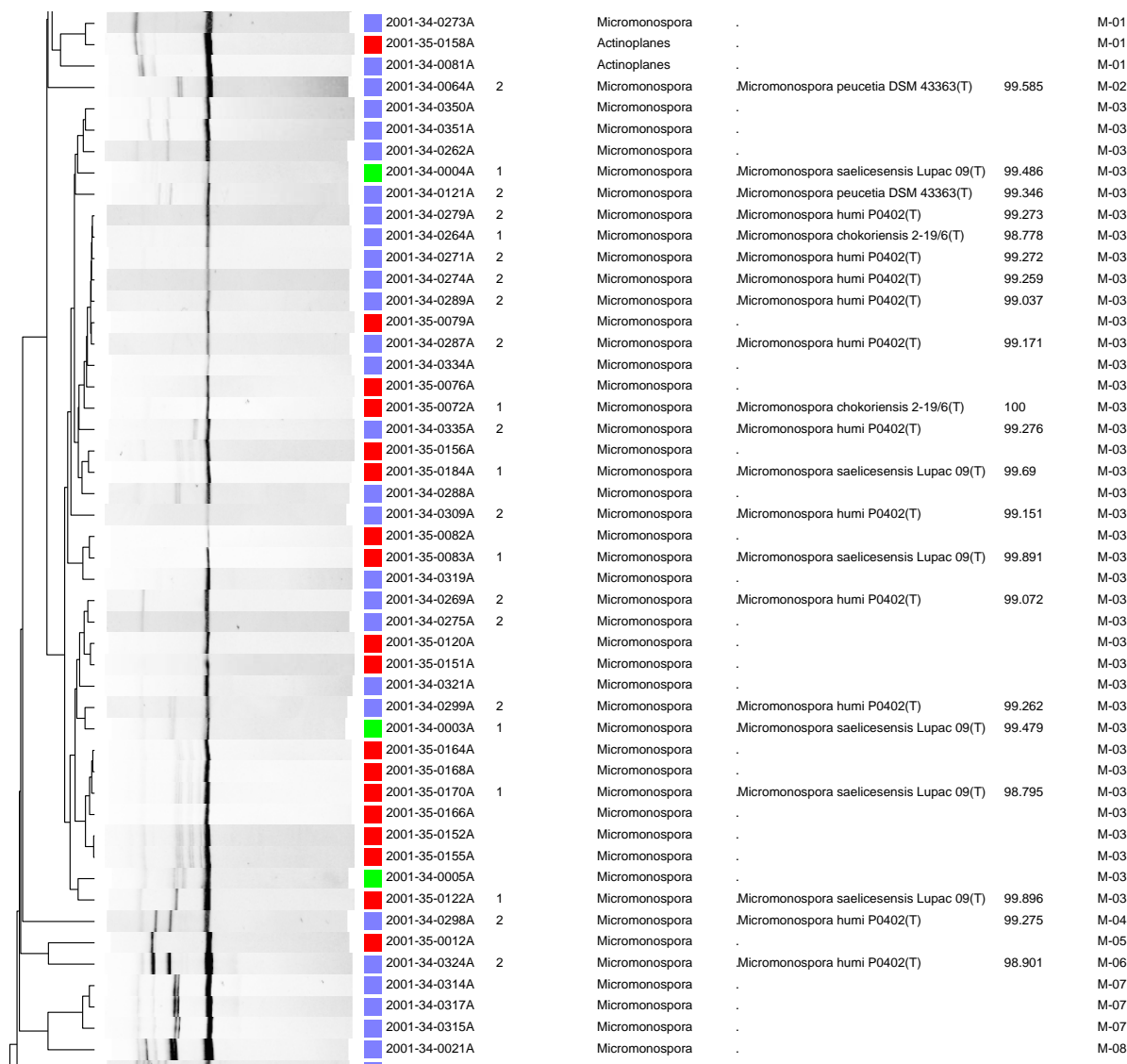
4.6.2.1. Amplificación de la región intergénica 16S-23S (IGS-PCR).

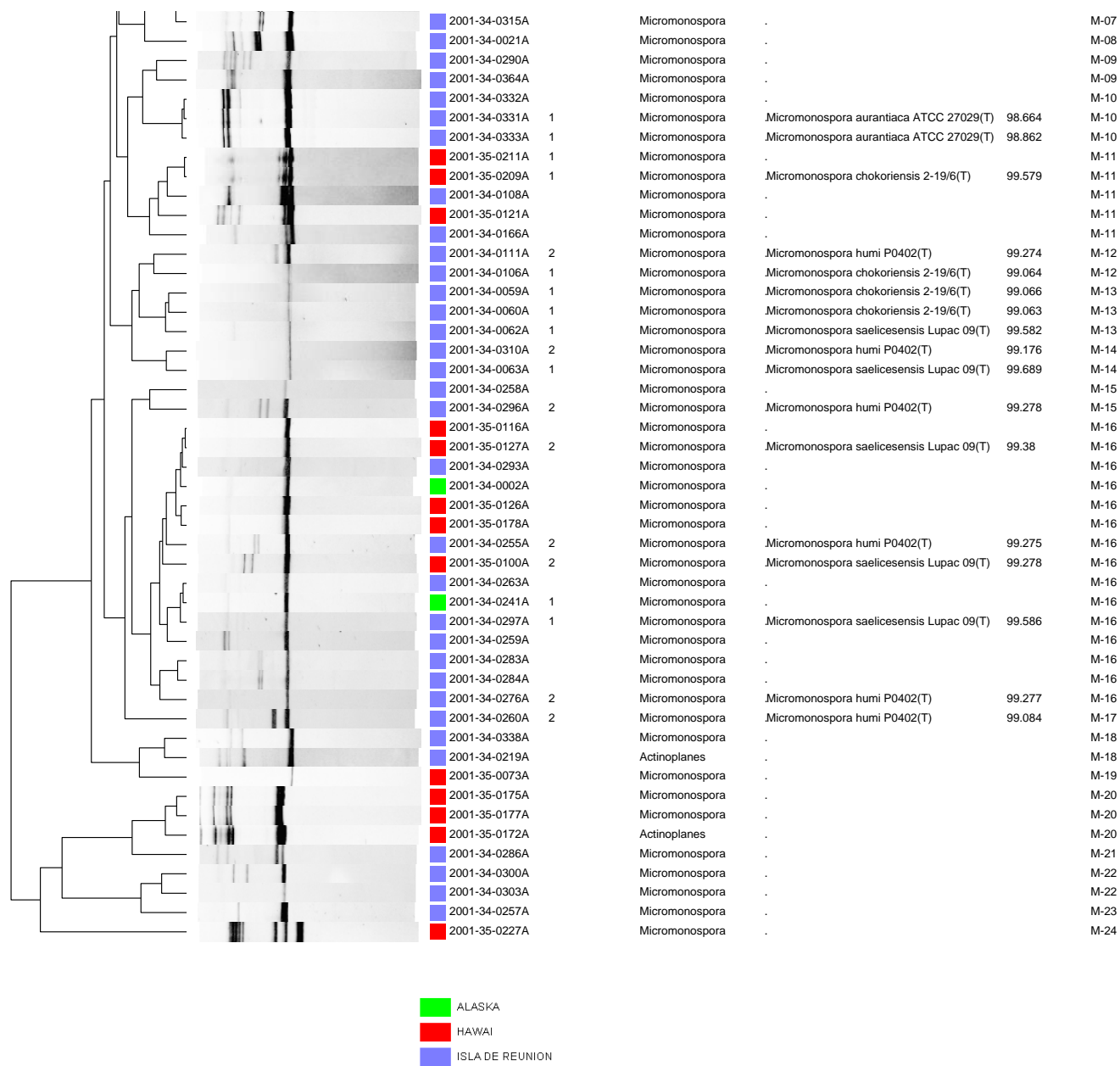
El grupo de las 135 cepas de *Micromonosporaceae* se repartió en sólo 24 *clusters* definidos a un punto de corte del 80% de similitud (**Figura 15**). Como veremos más tarde, el número total de *clusters* es muy inferior al de cualquier otra técnica, incluida la de ARNt-PCR y por tanto hay mayor número de *clusters* grandes que agrupan un alto número de cepas. En consecuencia, el número de cepas que forman *clusters* únicos es muy bajo, encontrando sólo 10 cepas con patrones de amplificación únicos, aunque algunos de ellos pueden asociarse claramente a otros *clusters* con puntos de corte mayores. Además, existen otros 14 *clusters*, que agrupan 125 cepas, con patrones de amplificación prácticamente idénticos y que incluyen desde 2 hasta 43 cepas.

Dado el tamaño de los *clusters*, pocas conclusiones pueden sacarse en cuanto al origen de las cepas o a la diversidad de los cultivos que los integran, ya que los *clusters* son heterogéneos en ambos sentidos.

Figura 15: Dendrograma de las cepas de la familia *Micromonosporaceae* resultante del análisis de IGS 16S-23S.







4.6.2.2. tADN-PCR.

Otra de las técnicas de PCR-*fingerprinting* utilizada fue la de tADN-PCR. El análisis de clusters basado en los perfiles de amplificación se realizó con 240 cepas de los 3 grupos taxonómicos mayoritarios. En los tres casos, esta técnica produjo unos patrones de amplificación bastantes buenos pero con un número pequeño de bandas en comparación con cualquiera de las técnicas anteriores y también con tamaños de bandas más pequeños, que variaban desde menos de 0,05 kb hasta aproximadamente 0,5 kb en el caso de las *Micromonosporaceae* y sólo 0,5 en el caso de las *Pseudonocardiaceae* y de los *Streptomyces*.

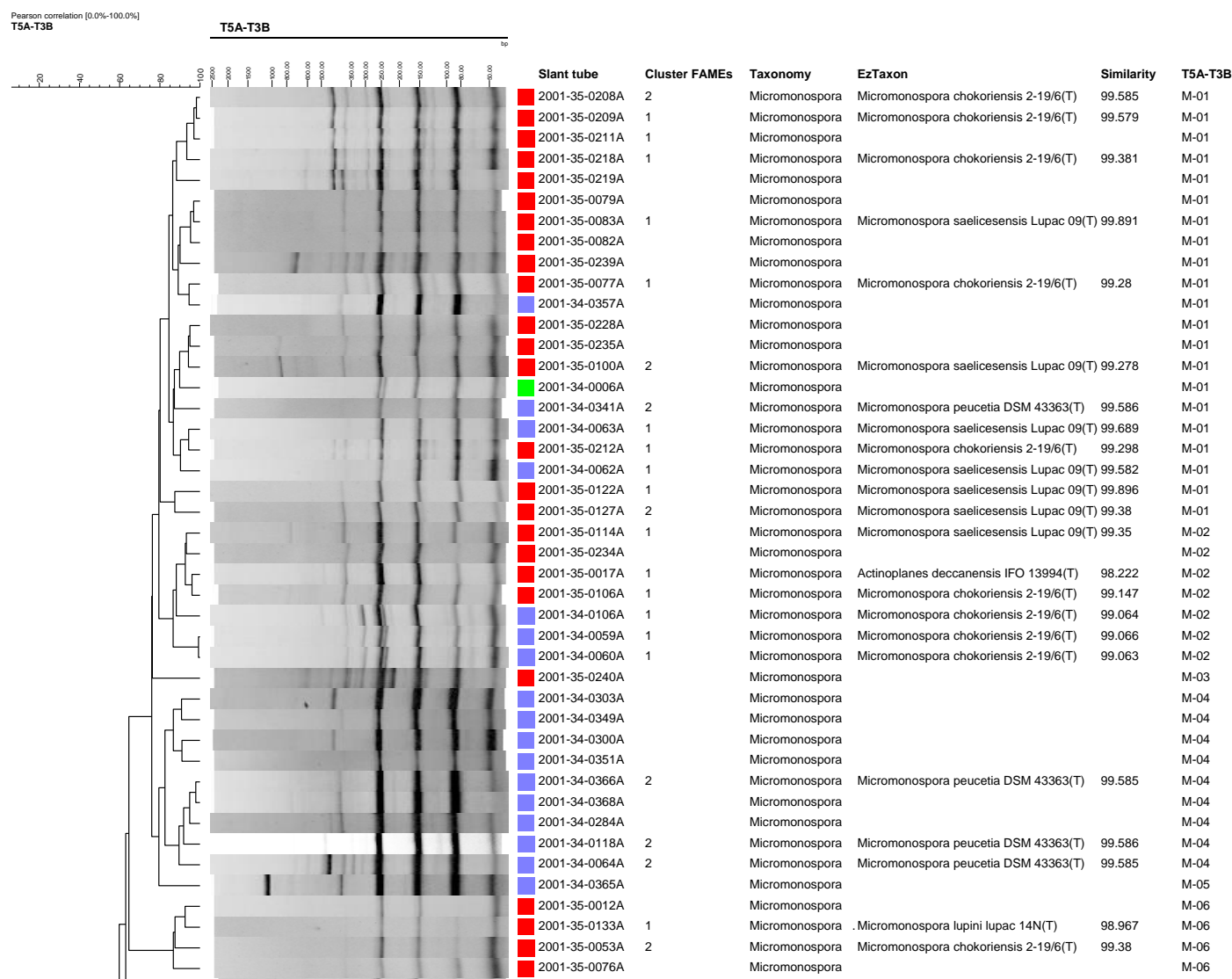
El grupo de las 135 cepas de *Micromonosporaceae* se repartió en 55 *clusters* definidos a un punto de corte del 80% de similitud (Figura 16). En general, podemos ver que con este análisis el número total de *clusters* es menor si lo comparamos con las técnicas de rep-PCR y por tanto hay más *clusters* grandes que agrupan un número de cepas mayor, como ocurría en el caso de IGS-PCR. En consecuencia, el número de cepas que forman *clusters* únicos es muy inferior al encontrado con otras técnicas y sólo se observan 30 cepas con patrones de amplificación únicos, aunque algunos de ellos pueden asociarse claramente a otros *clusters* con más de una cepa a puntos de corte mayores. Además, existen otros 25 *clusters*, que agrupan 105 cepas, con patrones de amplificación prácticamente idénticos y que incluyen desde 2 hasta 21 cepas.

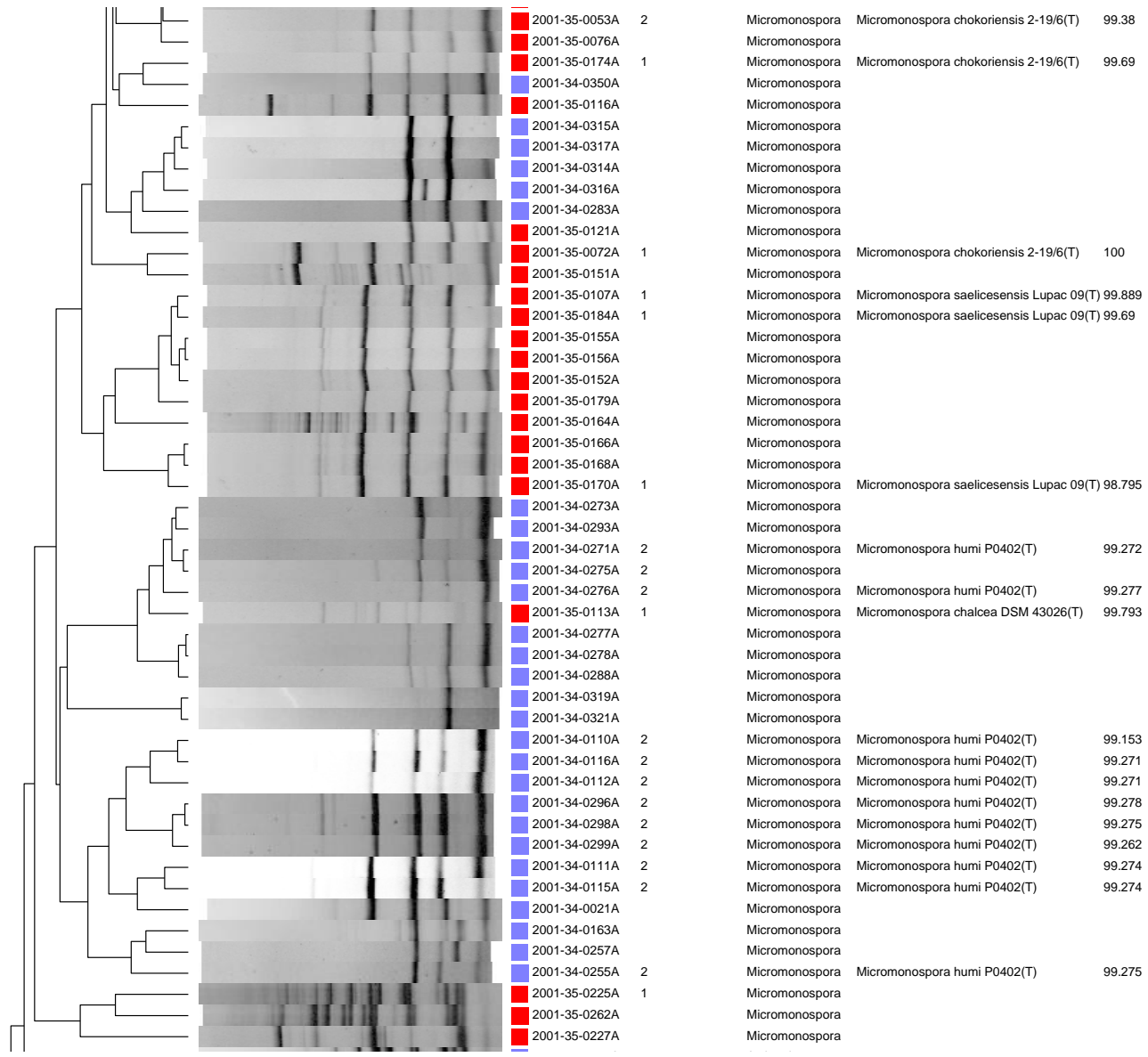
De los *clusters* con más de una cepa, 18 cultivos están incluidos en 9 *clusters* con sólo 2 representantes. Podemos observar que varios de los *clusters* grandes no son muy homogéneos, ya que encontramos cepas con distintas taxonomías. Este es el caso de los *clusters* 1, que contiene 21 cepas y el *cluster* 2, que incluye otras 7 cepas con varias identificaciones en ambos casos como *M. chokoriensis* (9 cepas), *Micromonospora saelicesensis* (7 cepas), *M. peucetia* (1 cepa) y una cepa de *Actinoplanes deccanensis*, junto con 10 cepas sin secuenciar. Este resultado no es de extrañar si tenemos en cuenta el bajo número de bandas que se obtienen. Por el contrario, también encontramos cepas que teniendo la misma identificación, se reparten en varios *clusters*. Las cepas identificadas como *M. humi* se reparten en varios *clusters*: por un lado el gran *cluster* formado por los *clusters* 17 al 26, en donde se agrupan 23 cepas, 11 de las cuales clasificadas como *M. humi*; y por otro lado, el *cluster* formado por los *clusters* del 35 al 45, que contienen otras 10 cepas de *M. humi* junto a otros 22 cepas, entre los que podemos ver las dos cepas de *M. tulbaghiae*, aisladas de Hawai. Lo mismo ocurre con las cepas de *M. peucetia* que se reparten entre el *cluster* 1 (1 cepa), el 4 (3 cepas) y el 46 y 47 (2 cepas, una en cada uno de ellos).

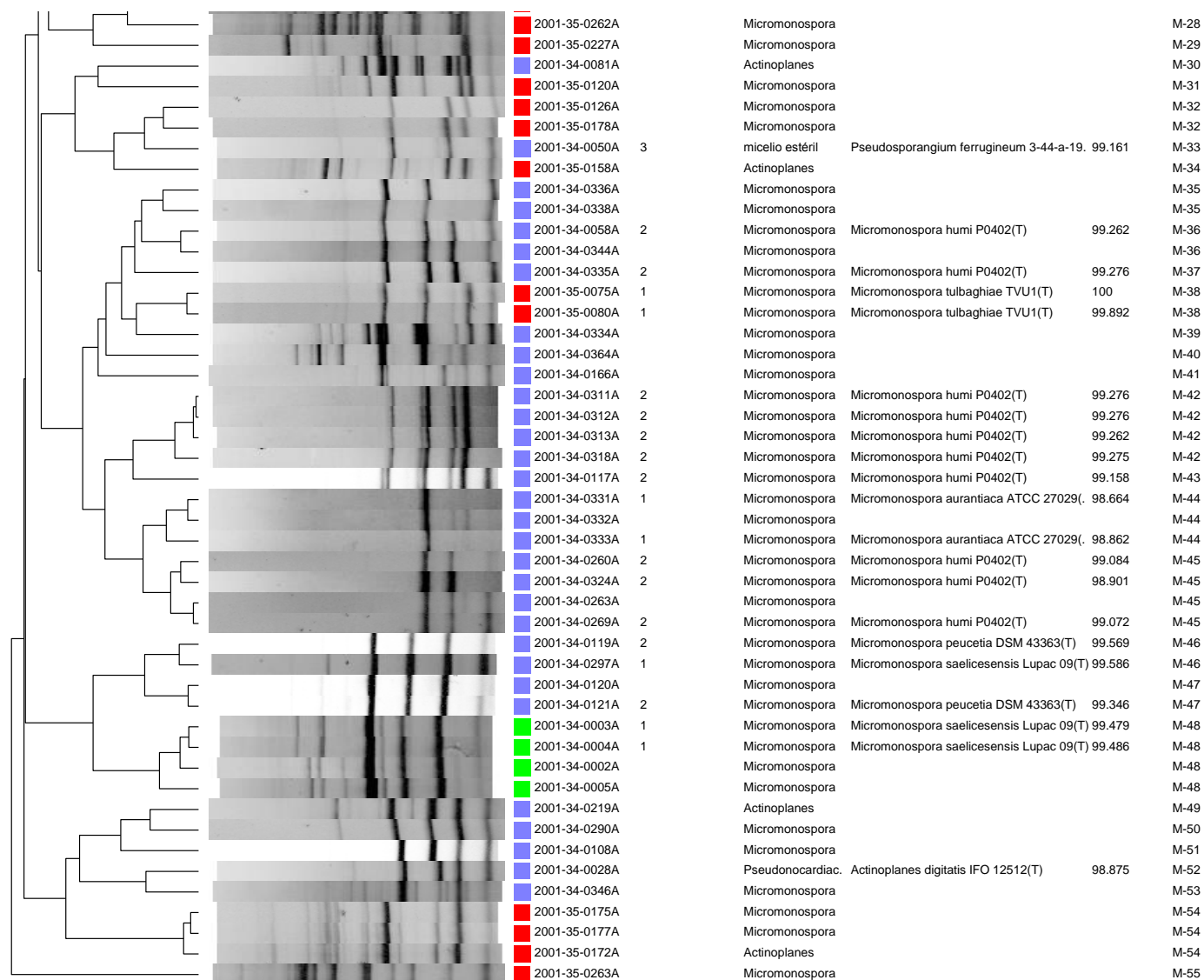
En cuanto a los orígenes, podemos ver que no hay una tendencia clara a agruparse según el mismo origen, dado que al formarse *clusters* grandes encontramos cultivos con diversos orígenes (*clusters* 1 y 2) aunque hay ejemplos en los que sí que se mantiene la homogeneidad de los *clusters* en cuanto al origen como el *cluster* 4, con cepas de *M. peucetia*, los *clusters* 14 al 16, con cepas de Hawai de *Micromonospora saelicesensis*, los *clusters* 17 al 26, con 22 cepas de Reunión, más 1 cepa de Hawai, los *clusters* 42 al 45 con

otras cepas de *M. humi* de Reunión o por último, 4 de los 5 cepas de Alaska que forman en el *cluster* 48.

Figura 16: Dendrograma de las cepas de la familia *Micromonosporaceae* resultante del análisis de tADN-PCR.







ALASKA
HAWAII
ISLA DE REUNION

4.6.2.3. rep-PCR.

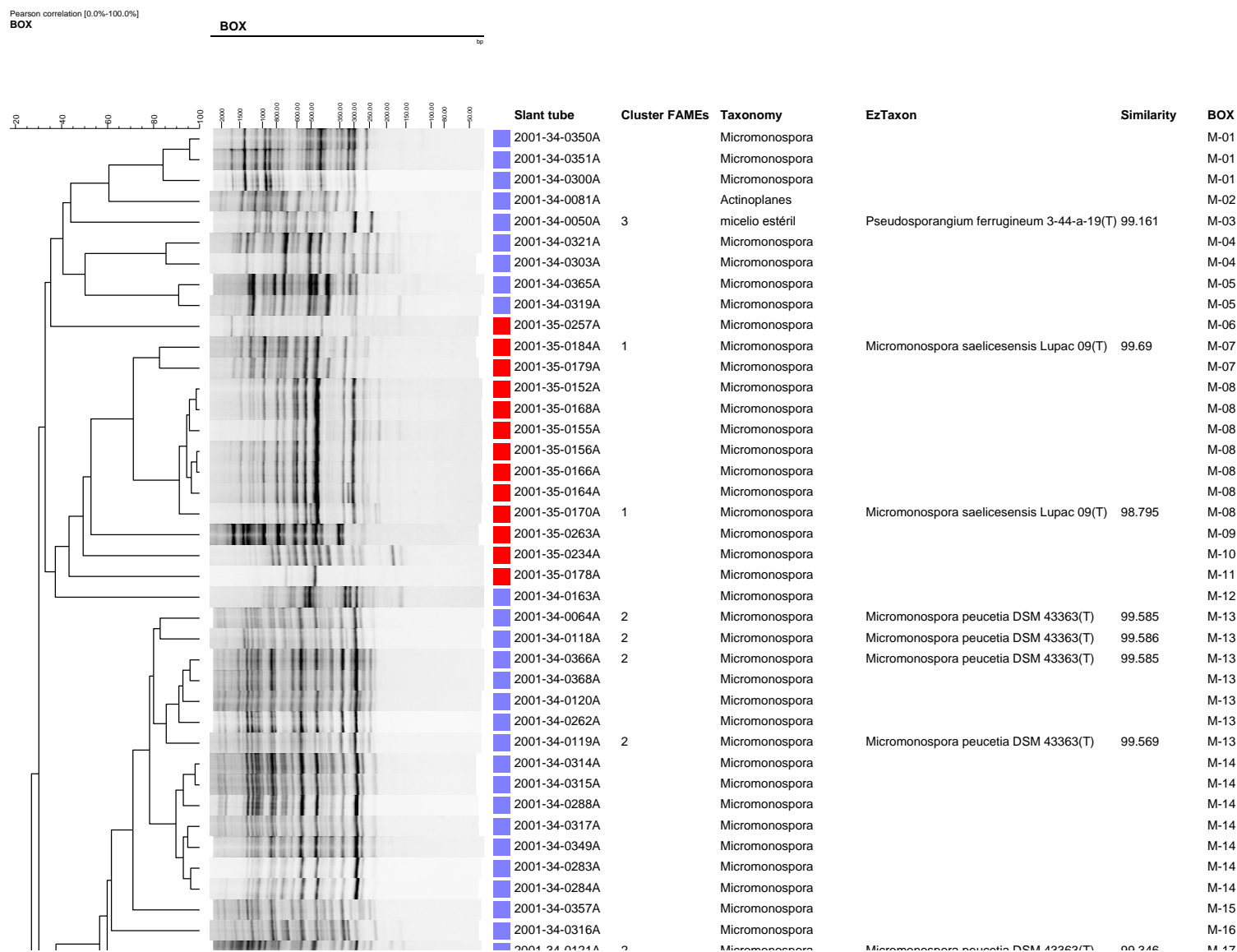
a.- BOX-PCR

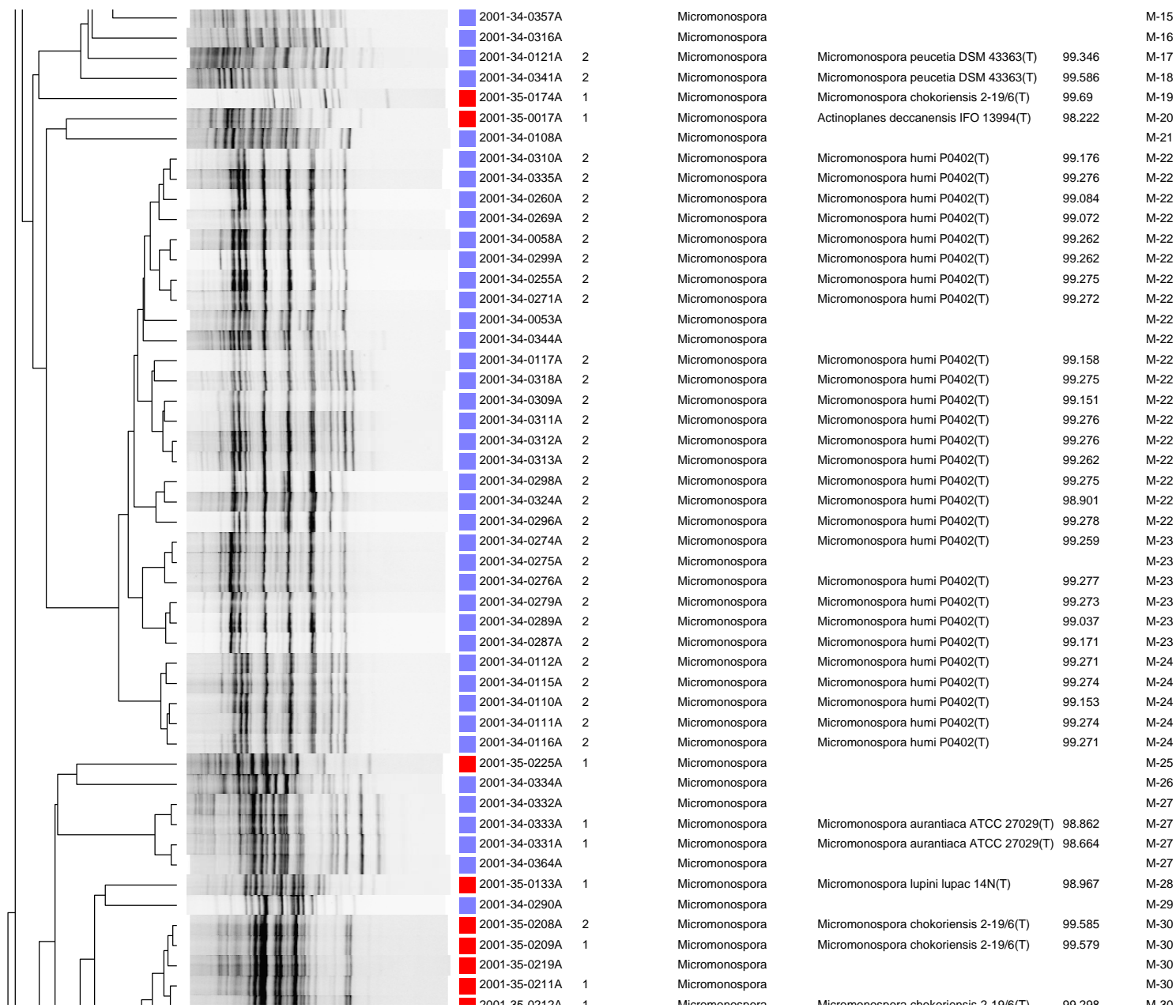
El grupo de las 155 cepas de *Micromonosporaceae* incluye 134 *Micromonospora* spp., 7 *Actinoplanes* spp y 14 cultivos estériles. Estas 155 cepas se agruparon en 74 *clusters* definidos como siempre a un punto de corte del 80% de similitud (**Figura 17**). El análisis de los datos reveló tres grupos de patrones de amplificación: 1) patrones únicos para 43 de las cepas; 2) un total de 24 *clusters*, incluyendo 105 cepas, que presentaban patrones de amplificación de BOX prácticamente idénticos y 3) al menos 7 cepas relacionadas con alguno de los *clusters* mencionados antes y que mostraban una similitud significativa pero que permanecían fuera de los *clusters* debido a las diferencias en algunas bandas.

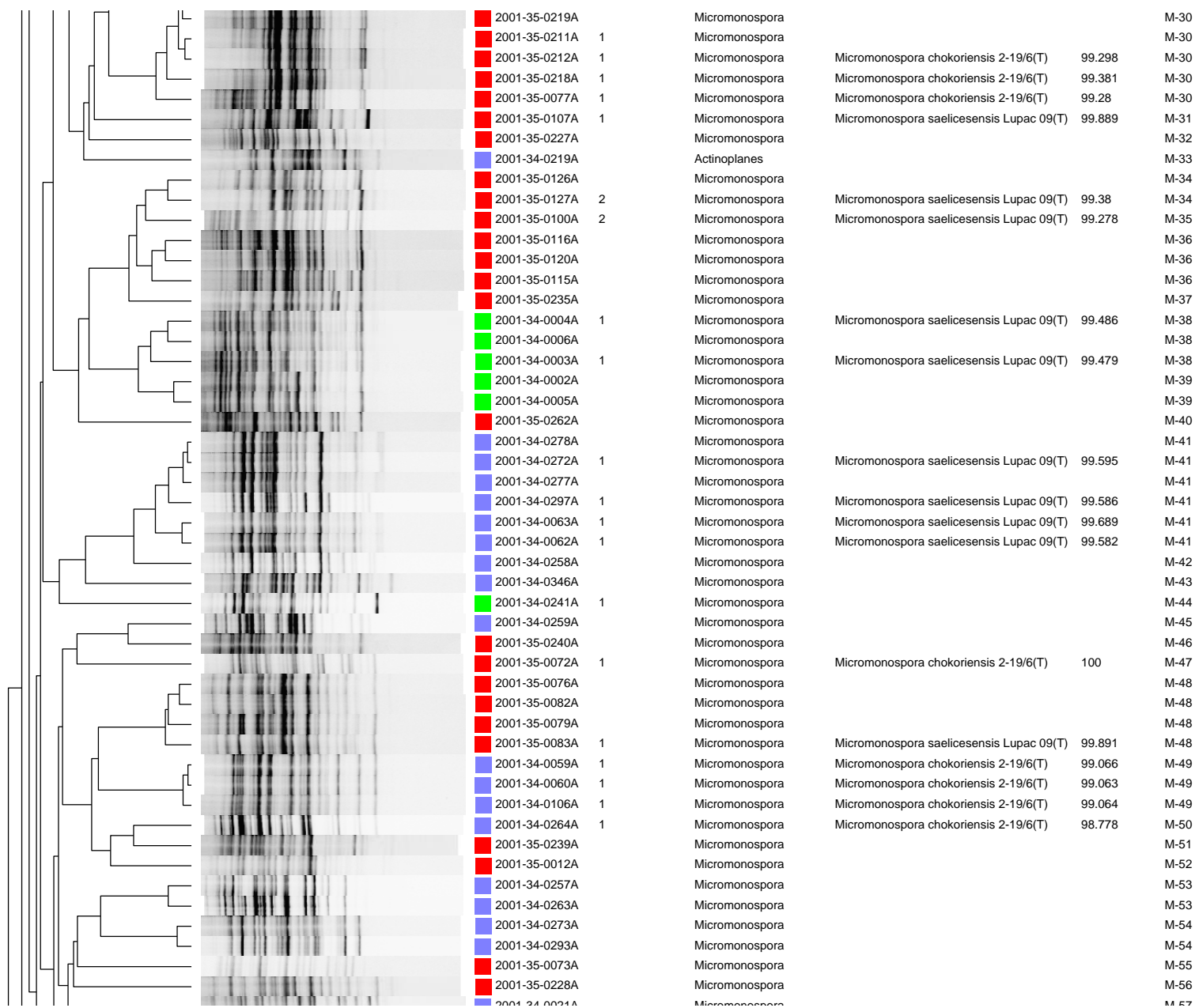
Además, de las 43 cepas con patrones de amplificación únicos, tenemos que, de los *clusters* con más de una cepa, 18 cultivos están incluidos en 9 *clusters* con sólo 2 representantes. Sin embargo, hay que destacar algunos *clusters* que contienen un alto número de cultivos, como los *clusters* 22, 23 y 24 que forman un *cluster* mayor formado por 30 cepas, 27 de ellas han sido secuenciadas y clasificadas como *M. humi*, más otras 3 no secuenciadas. De la misma forma que todas ellas se agrupaban en un solo *cluster* según la secuencia parcial 16S, ahora también se agrupan en un gran *cluster* claramente diferenciado. Además, estas 30 cepas fueron aisladas de muestras de la isla de Reunión. Otro caso de *clusters* con más de 2 cepas sería el de los *clusters* 13 y 14 junto con los 15, 16, 17 y 18 que se integran todos ellos en un *cluster* mayor formado por 18 cepas. Este grupo incluye 6 cepas clasificadas como *M. peucetia* más otras 12 cepas no secuenciadas. Como en el caso anterior, estos 18 cepas provienen de muestras de la isla de Reunión. Otros dos casos de *clusters* con más de dos cultivos serían el *cluster* 30, formado por 7 cepas de Hawai, de las que 5 de ellas han sido identificadas como *M. chokoriensis* o el caso del *cluster* 41 formado por 6 cepas de Reunión, 4 identificadas como *Micromonospora saelicesensis*. Un caso llamativo de un *cluster* formado por 2 cepas es el de los 2 cultivos de *Micromonospora tulbaghiae*, aislados de Hawai, que forman el *cluster* 61 y, como iremos viendo en las siguientes técnicas, siempre se agrupan formando un *cluster* distintivo.

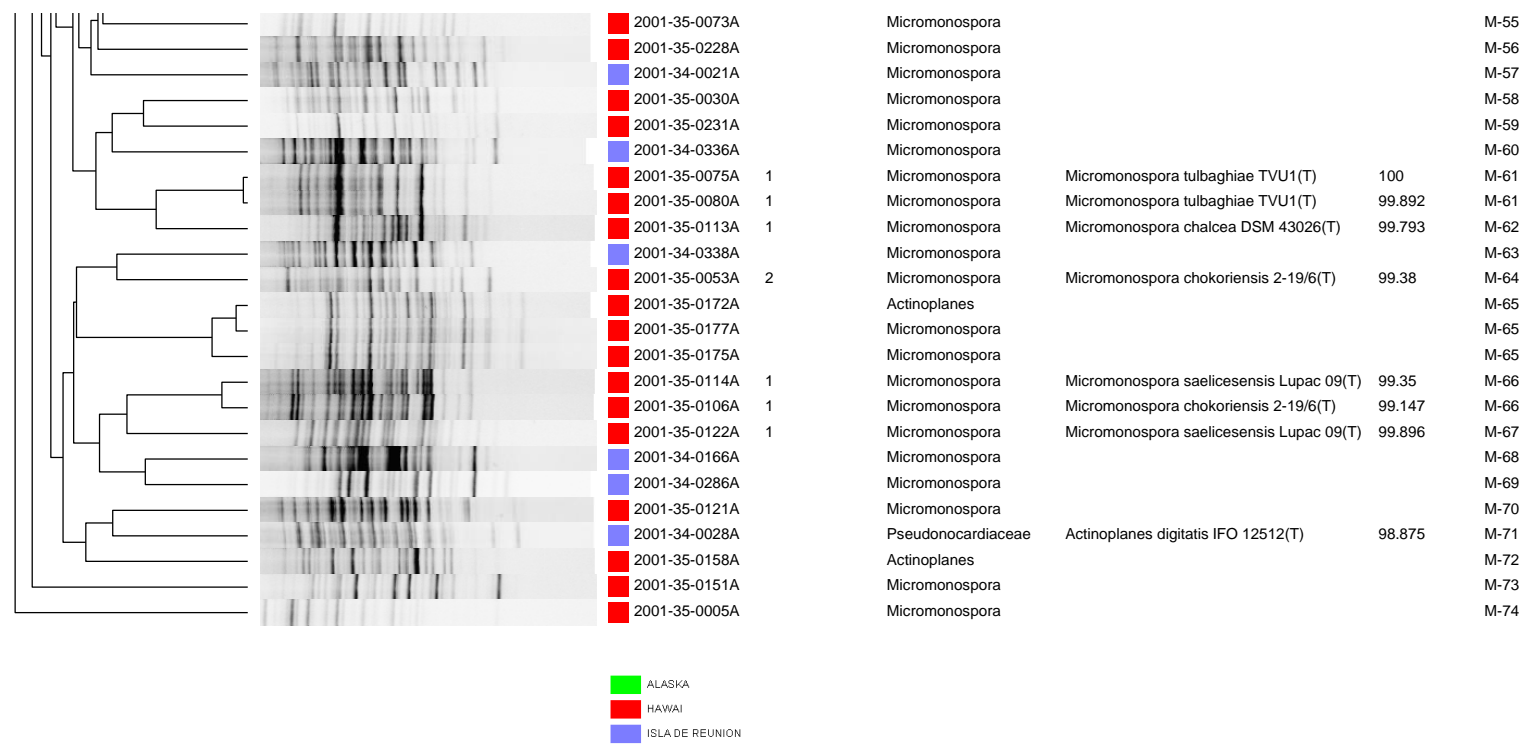
En cuanto a los orígenes, podemos ver que existe una clara tendencia de los cultivos a agruparse según su origen y vemos que los *clusters* con más de una cepa, todos ellos son homogéneos en cuanto a su origen, no encontrando en ningún caso *clusters* con cepas de más de un origen. De las 6 cepas de Alaska, 5 de ellos están agrupados en 2 *clusters* (38 y 39) formando un *cluster* mayor.

Figura 17: Dendrograma de las cepas de la familia *Micromonosporaceae* resultante del análisis de BOX-PCR.









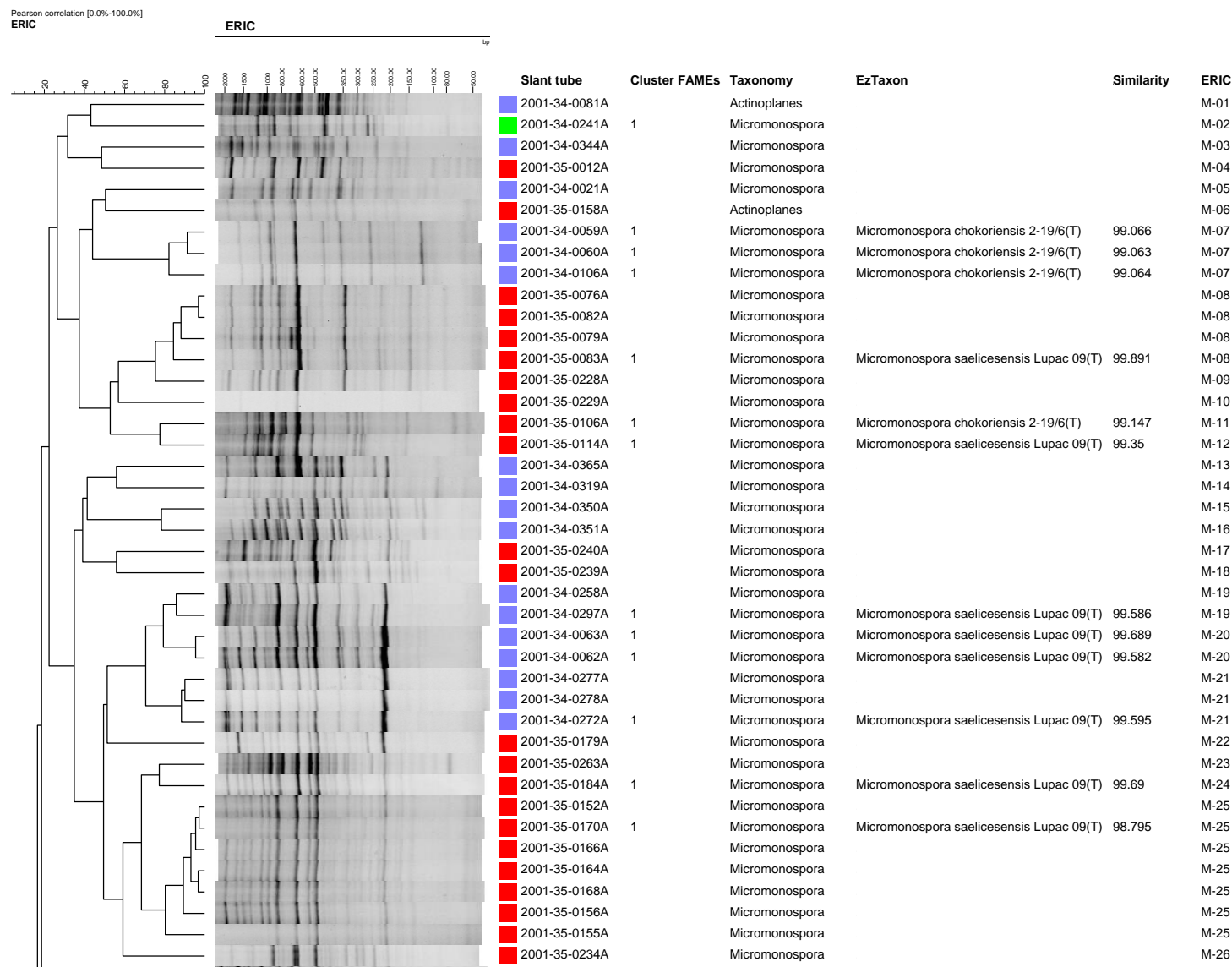
b.- ERIC-PCR.

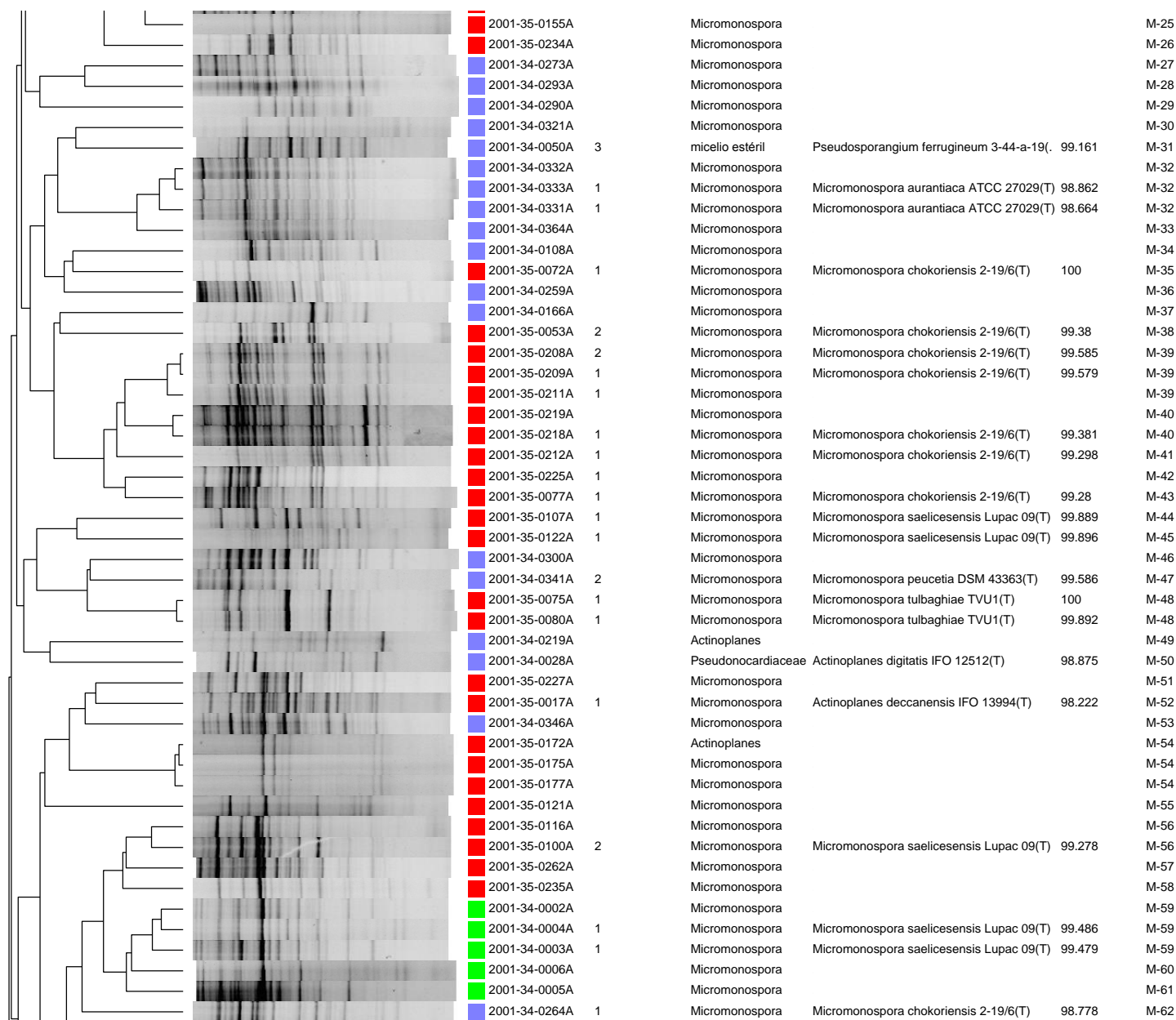
El grupo de *Micromonosporaceae* analizado estaba formado por 157 cepas, entre las que se incluían 136 *Micromonospora* spp., 7 *Actinoplanes* spp y 14 cultivos estériles. Estas 157 cepas se agruparon en 101 *clusters* definidos a un punto de corte del 80% de similitud (Figura 18). Según vemos en el dendrograma, existen 77 cepas con patrones de amplificación únicos ya que forman *clusters* con una sola cepa, aunque algunos de ellos pueden asociarse claramente a otros *clusters* con más de una cepa a puntos de corte mayores. Además, existen otros 24 *clusters*, que agrupan 80 cepas, con patrones de amplificación prácticamente idénticos y que incluyen desde 2 hasta 7 cepas.

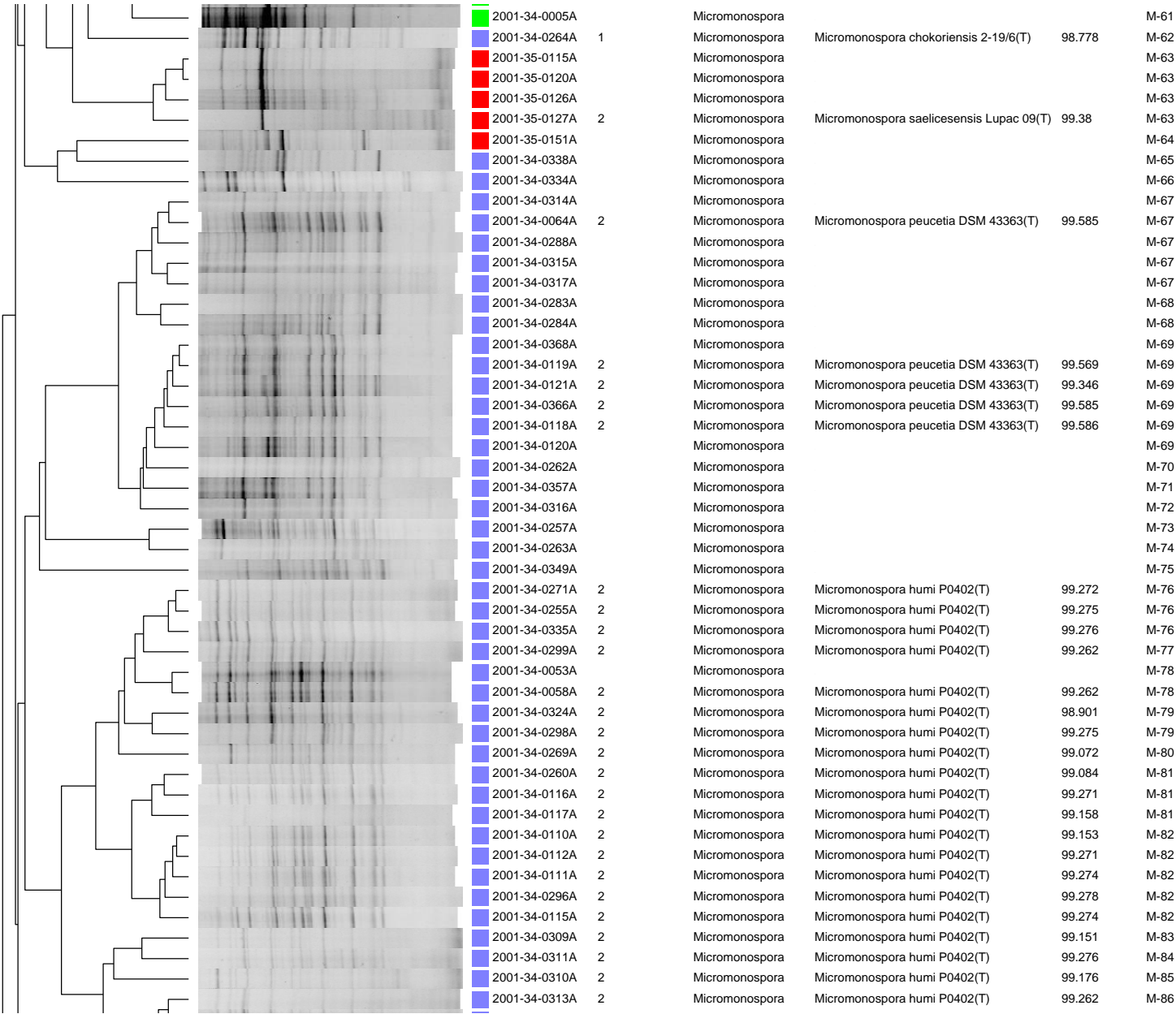
Como en el caso de BOX-PCR, podemos ver que hay varios *clusters* con más de una cepa que se unen claramente a otros *clusters* únicos formando un *cluster* mayor homogéneo ya que contiene cepas con la misma clasificación según su secuencia. Los *clusters* 13 al 26 agrupan 24 cepas, 6 de las cuales se identificaron como *Micromonospora saelicesensis*. Curiosamente este gran *cluster* puede subdividirse en otros dos *subclusters*, uno formado por cepas aisladas de Reunión y el otro por cultivos de Hawai. Otro grupo, como sucedía con BOX-PCR, sería el formado por los *clusters* 76 al 88, que incluye 30 cepas aisladas de Reunión, de las cuales, 27 estaban clasificadas como *M. humi*. Un tercer ejemplo, que también observamos en BOX-PCR, es el caso de los *clusters* 67 al 75, que agrupan 19 cepas, 5 de ellas clasificadas como *M. peucetia* más otras 14 cepas no secuenciadas. Como en el caso anterior, estas 19 cepas también provienen de Reunión. El último ejemplo de *clusters* con más de una cepa unidos a *clusters* únicos formando un *cluster* mayor homogéneo sería el caso de los *clusters* 37 al 43, formado 10 cultivos, incluyendo 6 cepas identificadas como *M. chokoriensis*. En este caso, todas las cepas fueron aisladas de Hawai. Como en BOX-PCR, las 2 cepas de *M. tulbaghiaie* forman otra vez un *cluster* único (*cluster* 48) distintivo.

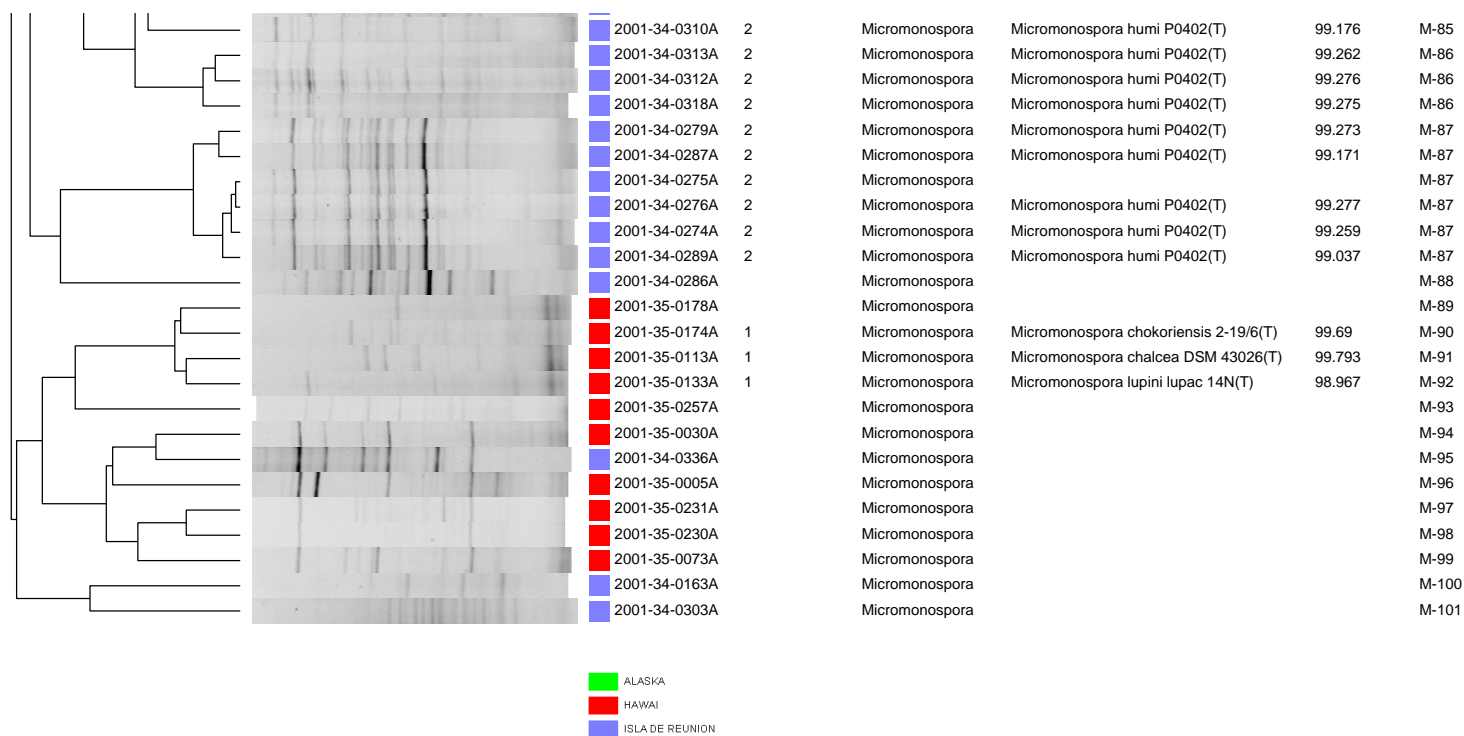
En cuanto a los orígenes, una vez más, podemos ver que existe una clara tendencia de los cultivos a agruparse según su origen ya que los *clusters* con más de una cepa son todos ellos homogéneos en cuanto a su origen, no encontrando en ningún caso *clusters* con cepas de más de un origen. Por ejemplo, de las 6 cepas de Alaska, 5 de ellos están agrupados en 3 *clusters* (59, 60 y 61) formando un *cluster* mayor.

Figura 18: Dendrograma de las cepas de la familia *Micromonosporaceae* resultante del análisis de ERIC-PCR.









c.- REP-PCR.

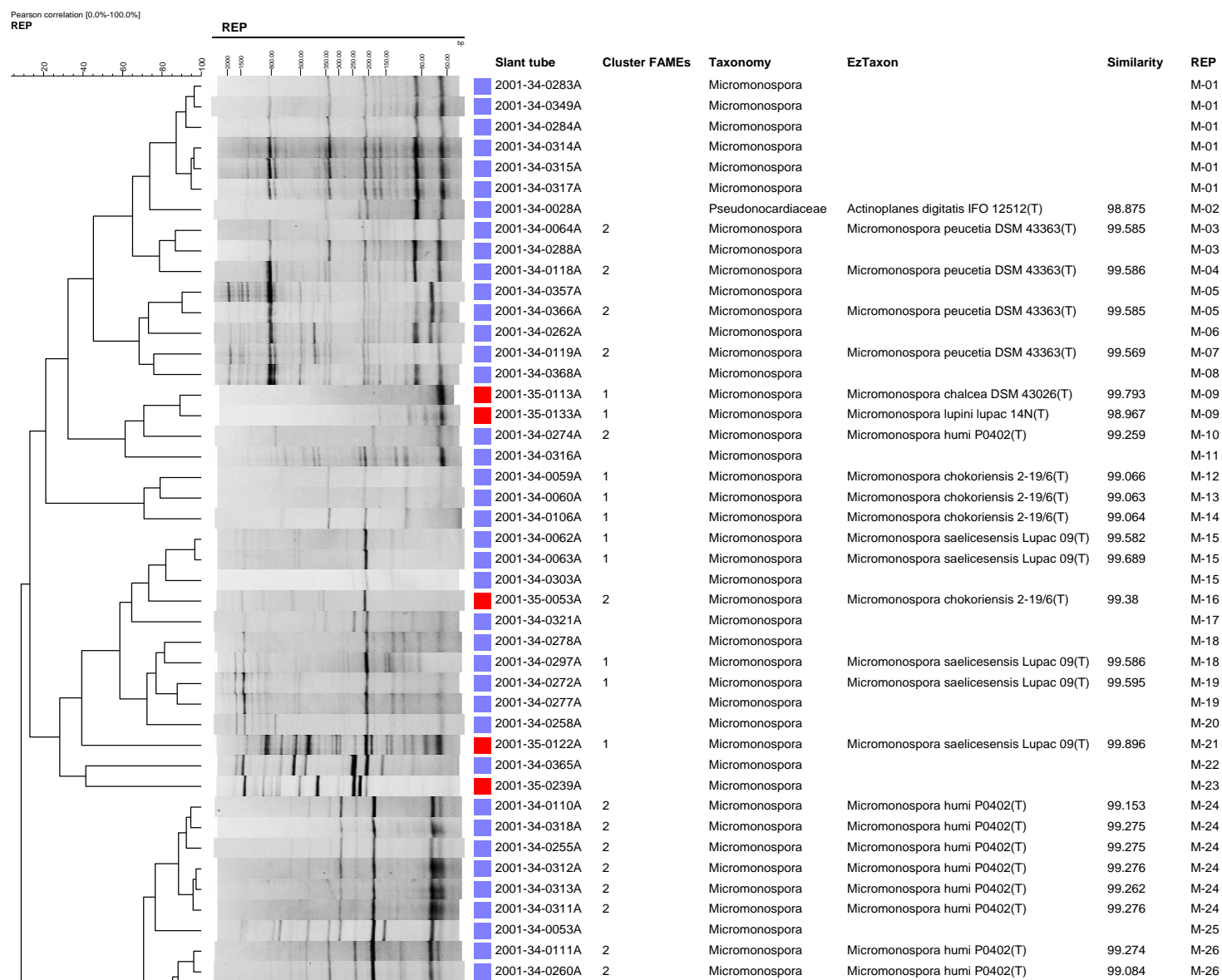
Se analizó con esta técnica un total de 146 cepas pertenecientes a la familia *Micromonosporaceae*, entre las que se incluían 129 *Micromonospora* spp., 6 *Actinoplanes* spp y 11 cultivos estériles. Estas 146 cepas se agruparon en 90 *clusters* definidos a un punto de corte del 80% de similitud (**Figura 19**). Según vemos en el dendrograma, existen 68 cepas con patrones de amplificación únicos ya que forman *clusters* con una sola cepa, aunque algunos de ellos pueden asociarse claramente a otros *clusters* con más de una cepa a puntos de corte mayores, como ocurre con las técnicas anteriores. Además, existen otros 22 *clusters*, que agrupan 78 cepas, con patrones de amplificación prácticamente idénticos y que incluyen desde 2 hasta 9 cepas.

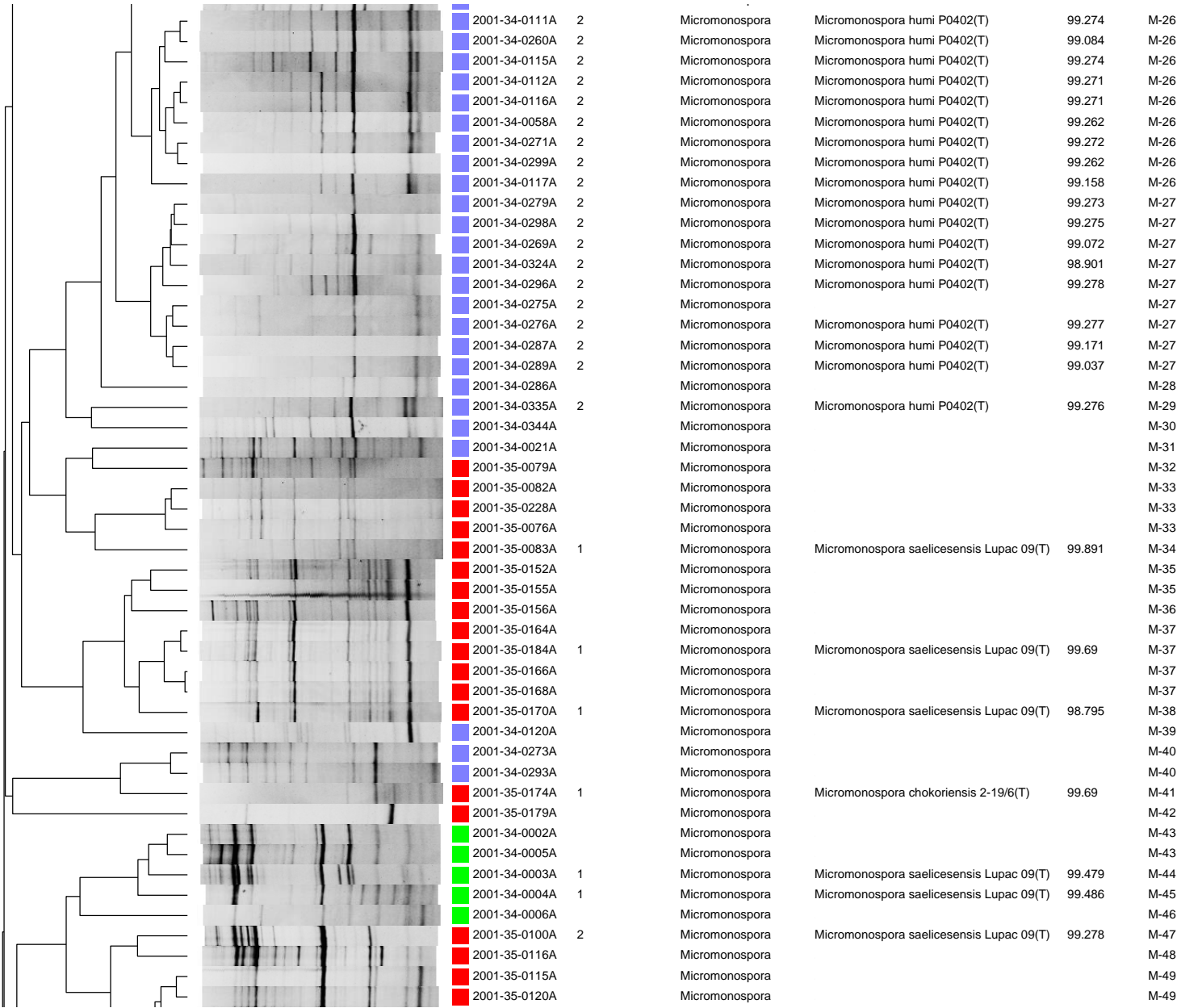
Como en las técnicas anteriores, podemos ver que 24 de las cepas clasificadas como *M. humi* están integradas en un gran *cluster* formado por los *clusters* 24 al 30, que incluyen un total de 28 cepas. Sin embargo, en este caso, una de las cepas identificadas como *M. humi* no está incluida en este gran *cluster* como sucedía en las otras técnicas, sino que se segrega en un *cluster* único independiente del anterior (*cluster* 10). Como ya hemos visto en las técnicas anteriores, las 2 cepas de *M. tulbaghia* forman un *cluster* independiente (*cluster* 71).

Contrariamente a lo que sucedía con las otras técnicas, las cepas de *Micromonospora saelicesensis*, las de *M. chokoriensis* y las de *M. peucetia* se encuentran repartidas en varios *clusters*. Las 12 cepas de *M. chokoriensis* se reparten en 10 *clusters*, aunque 3 de ellas, aisladas de Hawai se agrupan en el mismo *cluster* (*cluster* 57); las 6 cepas de *M. peucetia* se localizan en 6 *clusters* y las 14 cepas de *M. saelicesensis* se encuentran en 13 *clusters* distintos. En este último caso, podemos ver que 5 de las cepas están incluidas en un *cluster* grande formado por los *clusters* 15 al 23, integrado por 13 cepas en total y que las dos cepas de *M. saelicesensis* de Alaska, están en los *clusters* 43 al 46, junto con otras 3 cepas de Alaska no secuenciadas.

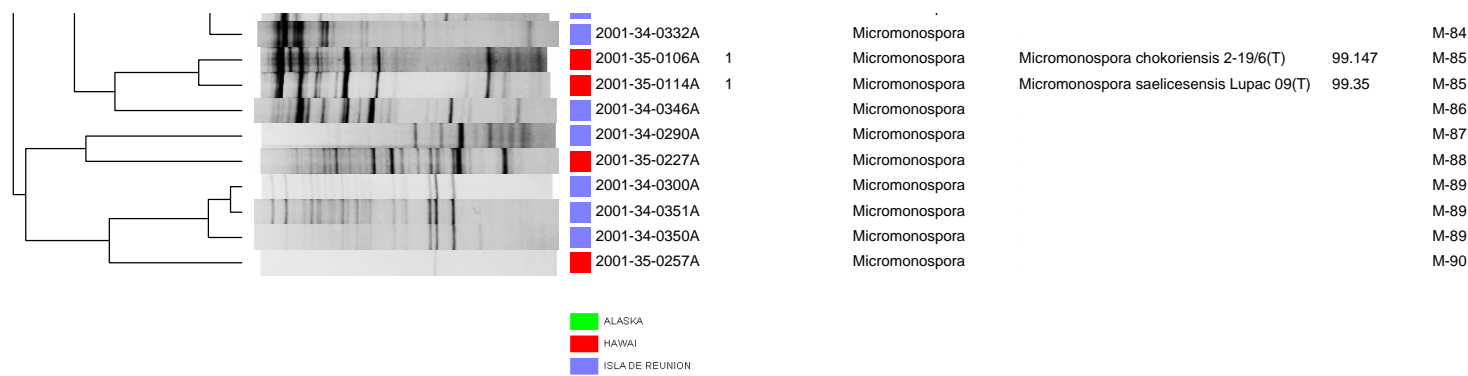
Con respecto a los orígenes, sí que existe con esta método coincidencia con las anteriores, ya que se repite la tendencia de los cultivos a agruparse según su origen, no encontrando en ningún caso *clusters* con cepas de más de un origen. Por ejemplo, una vez más, de los 6 cultivos de Alaska analizados, 5 de ellos están agrupados en 4 *clusters* (43 al 46) formando un *cluster* mayor.

Figura 19: Dendrograma de las cepas de la familia *Micromonosporaceae* resultante del análisis de REP-PCR.





			2001-35-0115A	Micromonospora			M-49	
			2001-35-0120A	Micromonospora			M-49	
			2001-35-0126A	Micromonospora			M-49	
			2001-35-0235A	Micromonospora			M-49	
			2001-35-0127A	2	Micromonospora	Micromonospora saelicesensis Lupac 09(T)	99.38	M-50
			2001-35-0073A		Micromonospora			M-51
			2001-35-0017A	1	Micromonospora	Actinoplanes deccanensis IFO 13994(T)	98.222	M-52
			2001-35-0107A	1	Micromonospora	Micromonospora saelicesensis Lupac 09(T)	99.889	M-53
			2001-35-0234A		Micromonospora			M-54
			2001-34-0050A	3	micelio estéril	Pseudosporangium ferrugineum 3-44-a-19(T)	99.161	M-55
			2001-35-0121A		Micromonospora			M-56
			2001-35-0211A	1	Micromonospora			M-57
			2001-35-0212A	1	Micromonospora	Micromonospora chokoriensis 2-19/6(T)	99.298	M-57
			2001-35-0208A	2	Micromonospora	Micromonospora chokoriensis 2-19/6(T)	99.585	M-57
			2001-35-0209A	1	Micromonospora	Micromonospora chokoriensis 2-19/6(T)	99.579	M-57
			2001-34-0219A		Actinoplanes			M-58
			2001-34-0241A	1	Micromonospora			M-59
			2001-34-0108A		Micromonospora			M-60
			2001-35-0262A		Micromonospora			M-61
			2001-35-0218A	1	Micromonospora	Micromonospora chokoriensis 2-19/6(T)	99.381	M-62
			2001-34-0081A		Actinoplanes			M-63
			2001-35-0151A		Micromonospora			M-64
			2001-35-0263A		Micromonospora			M-65
			2001-34-0121A	2	Micromonospora	Micromonospora peucetia DSM 43363(T)	99.346	M-66
			2001-34-0257A		Micromonospora			M-67
			2001-34-0263A		Micromonospora			M-68
			2001-34-0336A		Micromonospora			M-69
			2001-34-0334A		Micromonospora			M-70
			2001-35-0075A	1	Micromonospora	Micromonospora tulbaghia TVU1(T)	100	M-71
			2001-35-0080A	1	Micromonospora	Micromonospora tulbaghia TVU1(T)	99.892	M-71
			2001-34-0338A		Micromonospora			M-72
			2001-34-0264A	1	Micromonospora	Micromonospora chokoriensis 2-19/6(T)	98.778	M-73
			2001-35-0172A		Actinoplanes			M-74
			2001-35-0177A		Micromonospora			M-74
			2001-35-0175A		Micromonospora			M-74
			2001-34-0341A	2	Micromonospora	Micromonospora peucetia DSM 43363(T)	99.586	M-75
			2001-35-0225A	1	Micromonospora			M-76
			2001-35-0005A		Micromonospora			M-77
			2001-35-0012A		Micromonospora			M-78
			2001-35-0077A	1	Micromonospora	Micromonospora chokoriensis 2-19/6(T)	99.28	M-79
			2001-35-0219A		Micromonospora			M-80
			2001-34-0259A		Micromonospora			M-81
			2001-34-0319A		Micromonospora			M-82
			2001-35-0240A		Micromonospora			M-83
			2001-34-0331A	1	Micromonospora	Micromonospora aurantiaca ATCC 27029(T)	98.664	M-84
			2001-34-0333A	1	Micromonospora	Micromonospora aurantiaca ATCC 27029(T)	98.862	M-84
			2001-34-0364A		Micromonospora			M-84
			2001-34-0332A		Micromonospora			M-84
			2001-35-0106A	1	Micromonospora	Micromonospora chokoriensis 2-19/6(T)	99.147	M-85



d.- (GTG)₅-PCR.

Respecto a las cepas pertenecientes a la familia *Micromonosporaceae* se pudieron analizar un total de 154 cepas. Estas 154 cepas se agruparon en 87 *clusters* definidos en el punto de corte habitual del 80% de similitud (**Figura 20**). Como podemos ver en el dendrograma, existen 64 cepas con patrones de amplificación únicos que forman *clusters* con una sola cepa, aunque algunos de ellos pueden asociarse claramente a otros *clusters* con más de una cepa a puntos de corte mayores, como ocurre con las técnicas anteriores. Además, existen otros 23 *clusters*, que agrupan 90 cepas, con patrones de amplificación prácticamente idénticos y que incluyen desde 2 hasta 14 cepas.

Como viene ocurriendo con las técnicas anteriores, vemos que 26 de las cepas clasificadas como *M. humi* están integradas en un gran *cluster* formado por los *clusters* 68 al 81, que agrupan un total de 30 cepas, aunque hay que reseñar que una de las cepas (*cluster* 76) se identificó como *Actinoplanes deccanensis*, aislado de Hawai, mientras que las restantes 29 cepas proceden de Reunión. De nuevo, uno de los *clusters* formado por dos cepas es el *cluster* 13 formado por 2 cepas de *M. tulbaghiae*.

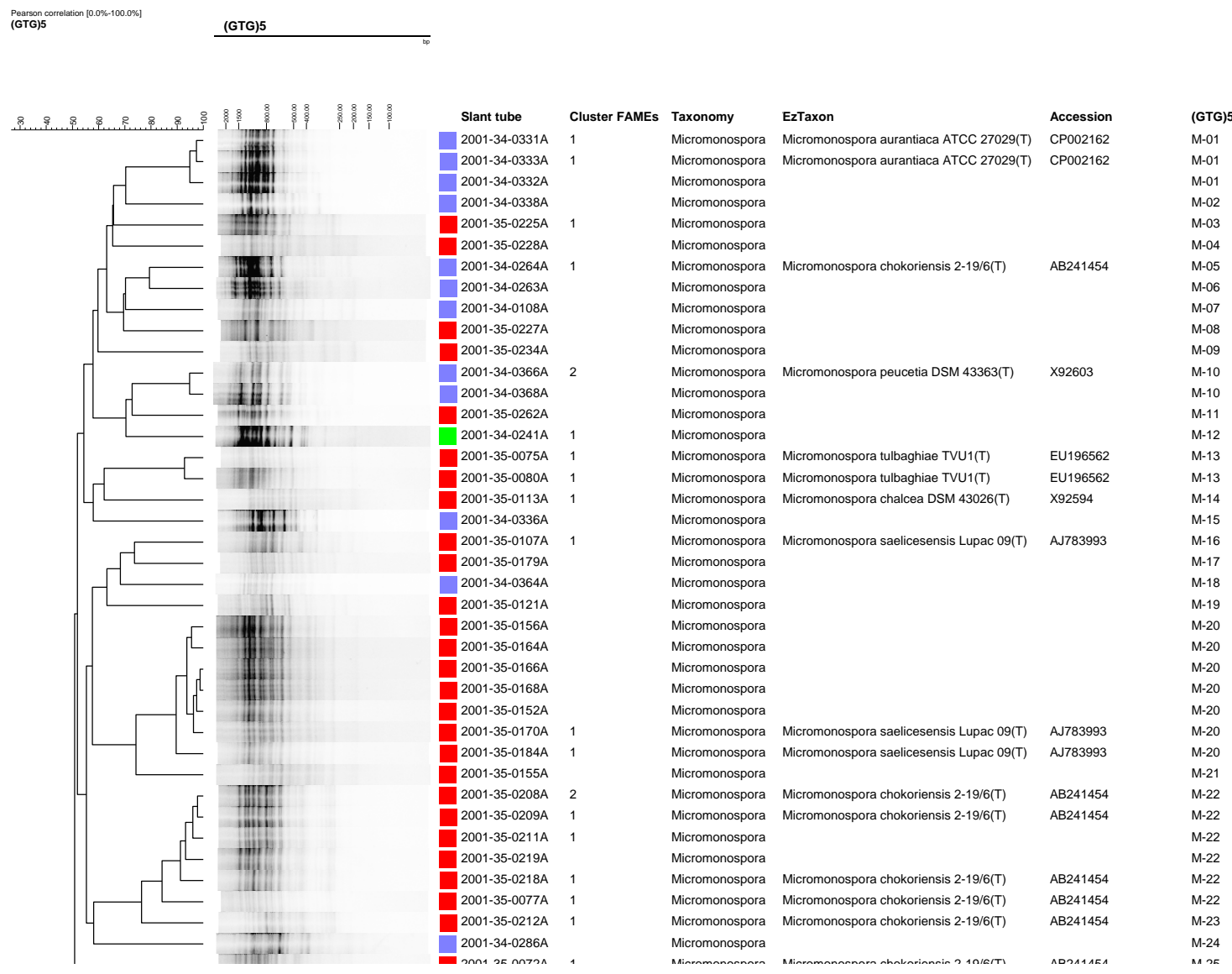
Como ya ocurría con BOX y ERIC-PCR, pero no con REP-PCR, 5 de las 6 cepas de *M. peucetia* se agrupan en un gran *cluster* formado por los *clusters* 42 y 43 junto con otras 10 cepas no secuenciadas. La sexta cepa de *M. peucetia* se encuentra muy alejada en el *cluster* 10 formado por dos cepas.

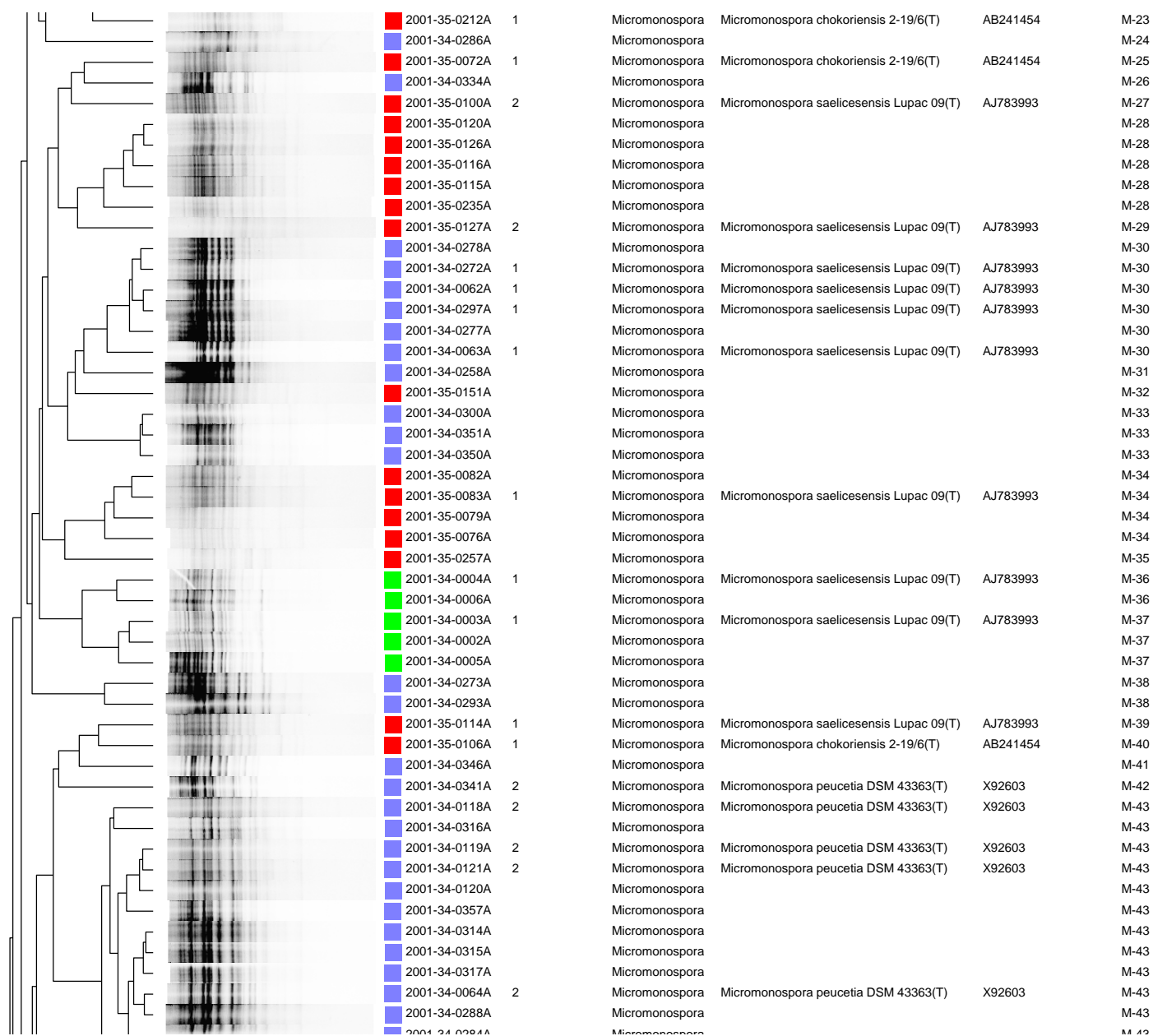
Las 14 cepas de *Micromonospora saelicesensis* las encontramos repartidas en diversos *clusters* aunque básicamente las encontramos incluidas en dos grandes *clusters*: en los *clusters* 16 al 21, encontramos 3 cepas de *M. saelicesensis*, junto con otras 9 cepas no secuenciadas; en los *clusters* 28 al 38, tenemos otras 8 cepas de *M. saelicesensis*, junto con otras 21 cepas no secuenciadas. Dentro de este gran *cluster*, podemos ver que las cepas de *M. saelicesensis* aisladas de Alaska se agrupan en los *clusters* 36 y 37.

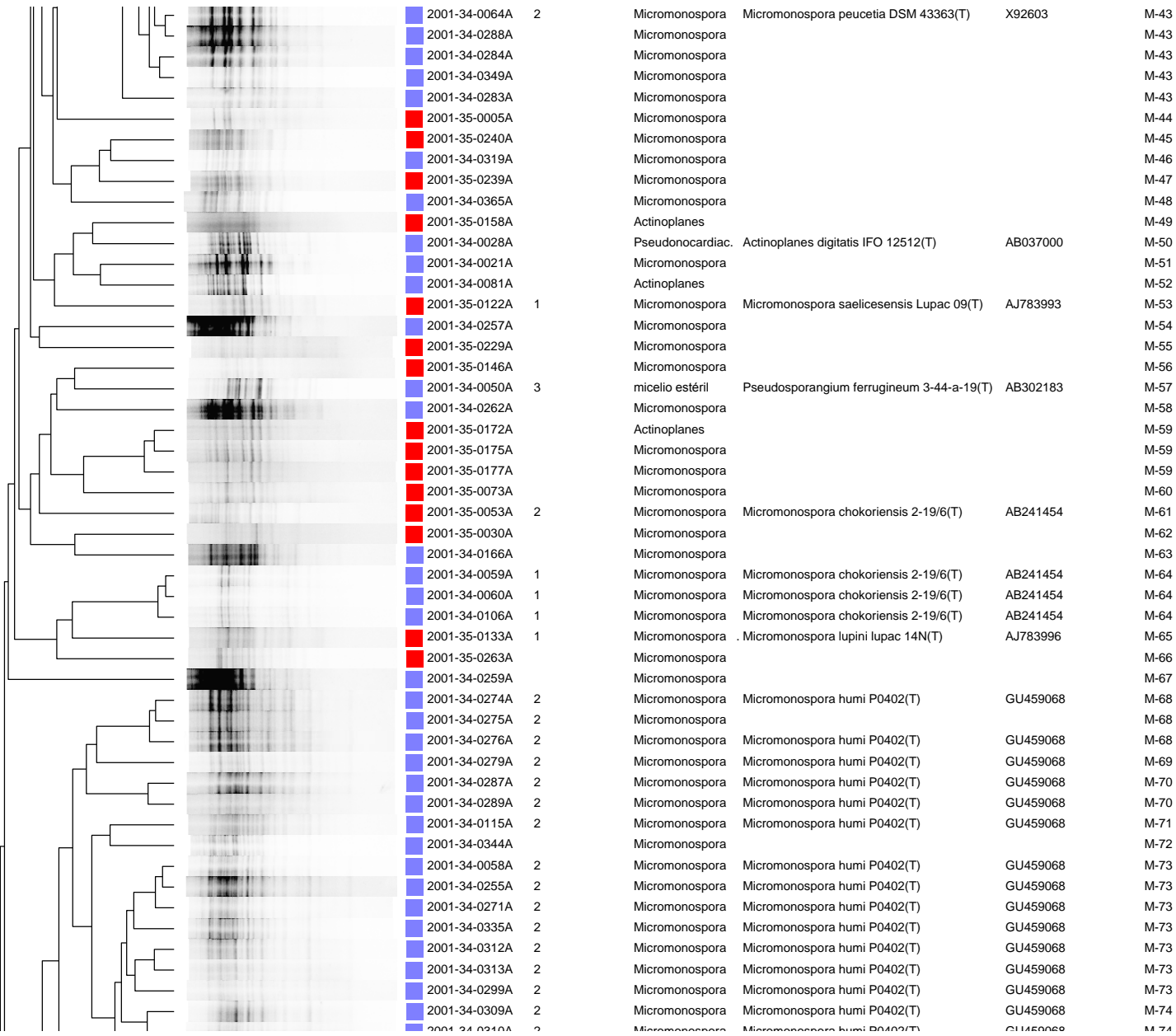
El caso de las 13 cepas de *M. chokoriensis* sucede algo parecido a lo que encontrábamos en BOX- y ERIC-PCR en donde cinco de las cepas se agrupan en un *cluster* mayor, en este caso el formado por los *clusters* 22 al 24, mientras que 3 de las 4 cepas de Reunión se agrupan en el *cluster* 64. Otro ejemplo de cepas agrupadas en un mismo *cluster* y con la misma afiliación taxonómica son los *clusters* 1, formado por dos cepas de *M. aurantiaca* más otra cepa no secuenciada.

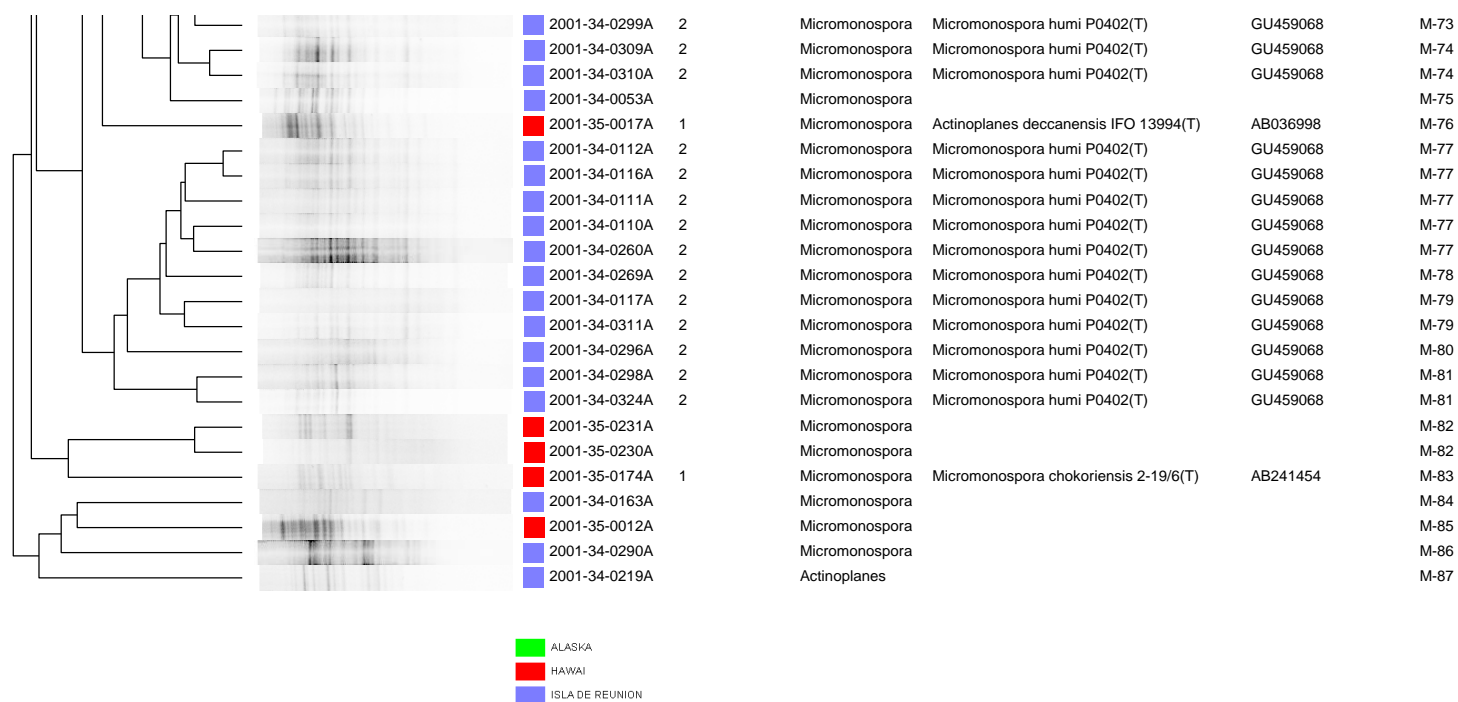
Con respecto a los orígenes, volvemos a ver, como con el resto de técnicas, que hay una clara tendencia de las cepas a agruparse según su origen, no encontrando en ningún caso *clusters* con cepas procedentes de más de un área geográfica distinta. Una vez más, de los 6 cepas de Alaska analizados, 5 de ellos están agrupados en los *clusters* 36 y 37 formando un *cluster* mayor.

Figura 20: Dendrograma de las cepas de la familia *Micromonosporaceae* resultante del análisis de (GTG)₅-PCR.









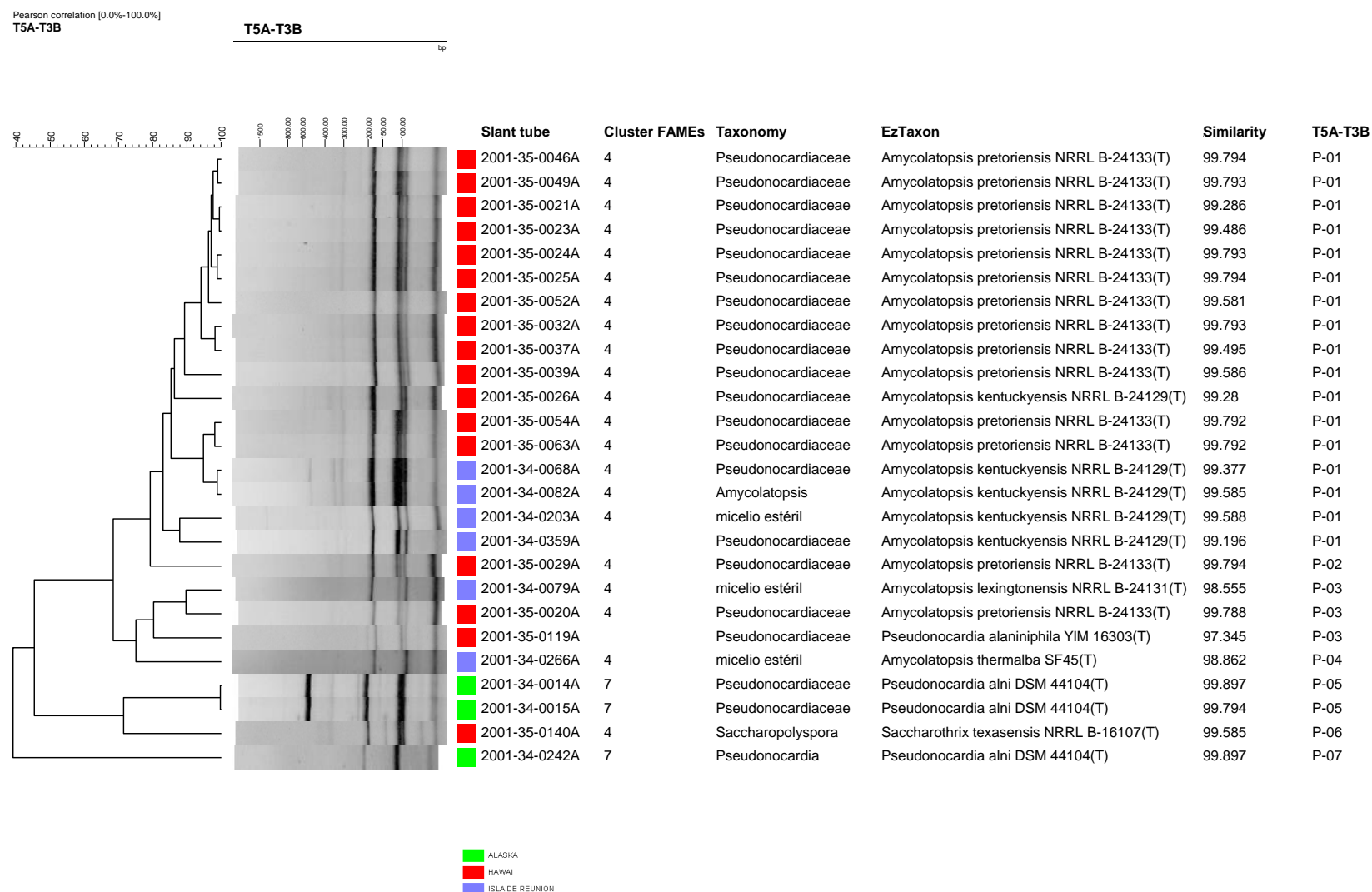
4.6.3. Caracterización de cepas de la familia *Pseudonocardiaceae*.

4.6.3.1. Amplificación de la región intergénica 16S-23S (IGS-PCR).

En el caso de las cepas de la familia *Pseudonocardiaceae*, sólo 6 cepas generaron perfiles de amplificación con estos cebadores con lo que no se realizó el análisis de *clusters* con ellos.

4.6.3.2. tADN-PCR.

Los 26 cultivos de la familia *Pseudonocardiaceae* estudiados se agruparon en sólo 7 *cluster* diferentes, definidos a un punto de corte del 80% de similitud (**Figura 21**), y además, sólo 4 de ellos con una única cepa. En este caso vemos que hay bastante correlación entre los *clusters* formados y los *clusters* de FAMEs. El bajo número de *clusters* puede atribuirse al bajo número de bandas que presentan estos patrones de amplificación como sucede con los otros grupos taxonómicos estudiados. De las 26 cepas analizadas, 17 de ellas se incluyen en el *cluster* 1 que junto con los *clusters* 2, 3 y 4 forman un *cluster* mayor formado por todas las cepas asignadas al género *Amycolatopsis*: *A. pretoriensis* (14 cepas), *A. kentuckyensis* (5 cepas), 1 *A. lexingtonensis*, 1 *A. thermalba* y 1 *Pseudonocardia alaniniphila*. El *cluster* 5 contiene las dos cepas de Alaska clasificados como *Pseudonocardia alni*.

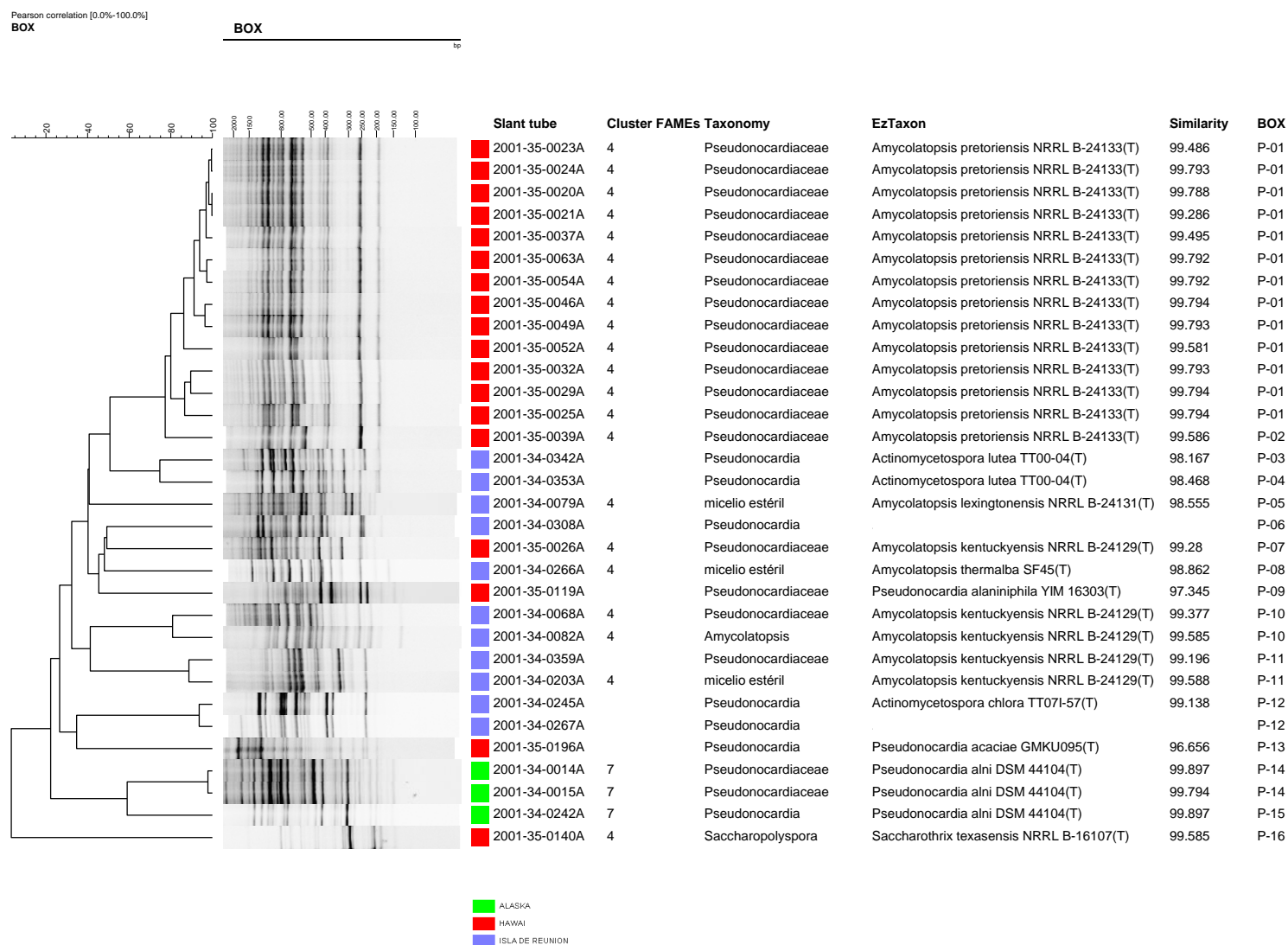
Figura 21: Dendrograma de las cepas de la familia *Pseudonocardiaceae* resultante del análisis de tADN-PCR.

4.6.3.3. rep-PCR.

a.- BOX-PCR.

Las 32 cepas de la familia *Pseudonocardiaceae* estudiadas se agruparon en 16 *clusters* diferentes definidos a un punto de corte del 80% de similitud (**Figura 22**), 11 de ellos con una única cepa, 4 de ellos con 2 cepas y por último los *clusters* 1 y 2 formados por las 14 cepas de *Amycolatopsis pretoriensis*, aisladas todas ellas de Hawai. Los 4 *clusters* formados por 2 cepas son: el *cluster* 10 y el 11 que contiene cada uno 2 cepas de *Amycolatopsis kentuckyensis* aisladas de todas ellas de Reunión; el *cluster* 12 con una cepa identificada por su secuencia como *Actinomycespora chlora* y otra cepa no secuenciada, aisladas también de Reunión; y el *cluster* 14 con dos cepas clasificadas como *Pseudonocardia alni* y aisladas de Alaska que podría unirse al *cluster* 15 con otra cepa de *P. alni* aislada también de Alaska. Los 9 *clusters* restantes con una única cepa se reparten en dos cepas clasificadas como *Actinomycespora*, una de *Amycolatopsis lexiingtonensis*, una *Amycolatopsis kentuckyensis*, una *Amycolatopsis thermalba*, una *Pseudonocardia alaniniphila*, una de *Pseudonocardia acaciae* y por último 1 cepa clasificada como *Saccharothrix texasensis*, y otra cepa no secuenciada.

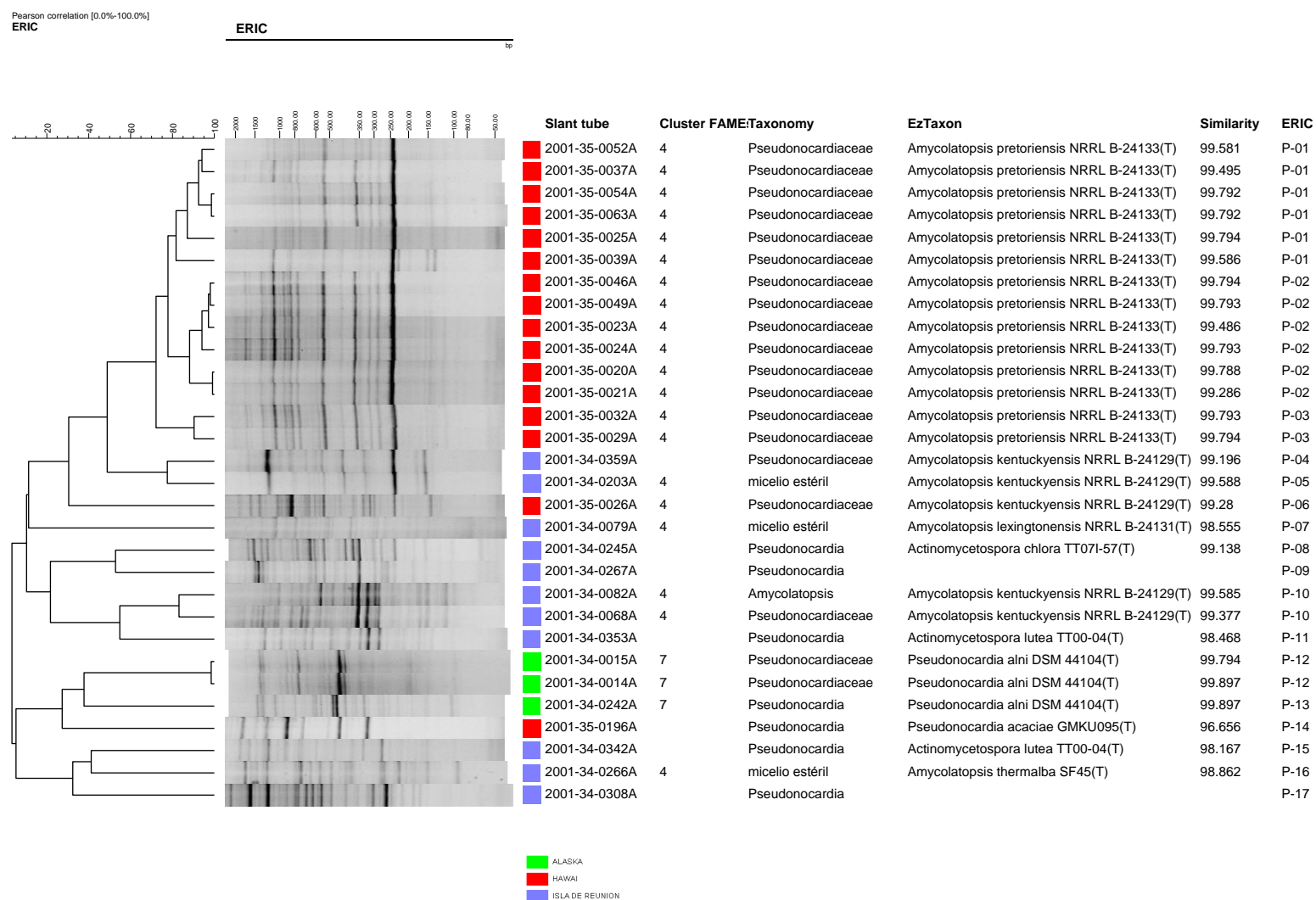
Figura 22: Dendrograma de las cepas de la familia *Pseudonocardiaceae* resultante del análisis de BOX-PCR.



b.- ERIC-PCR.

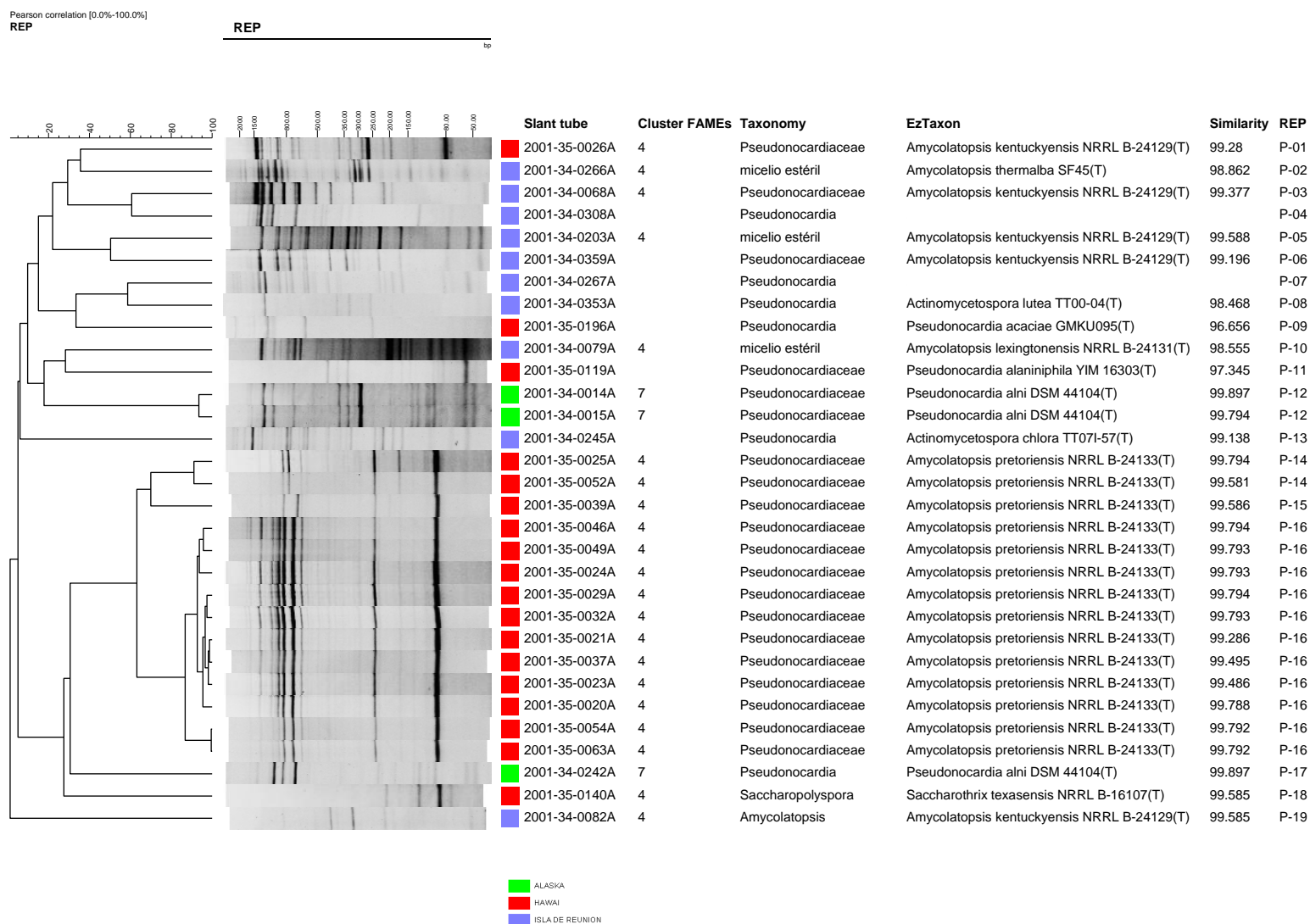
Los 30 cultivos de la familia *Pseudonocardiaceae* estudiados se agruparon en 17 *clusters* diferentes definidos en el punto de corte habitual del 80% de similitud (**Figura 23**), 12 de ellos con una única cepa, 3 de ellos con 2 cepas y otros dos *clusters* formados por 6 cepas cada uno. Estos dos últimos *clusters*, junto con el *cluster* 3, forman un *cluster* con 14 cepas identificadas todas ellas como *Amycolatopsis pretoriensis* aisladas de muestras de Hawai. Los otros dos *clusters* formados por 2 cepas son: el *cluster* 10 que contiene 2 cepas identificadas como *Amycolatopsis kentuckyensis* aisladas de Reunión y el *cluster* 12 con dos cepas clasificadas como *Pseudonocardia alni* y aisladas de Alaska que podría unirse al *cluster* 15 con otra cepa de *P. alni* aislada también de Alaska.

Figura 23: Dendrograma de las cepas de la familia *Pseudonocardiaceae* resultante del análisis de ERIC-PCR.



c.- REP-PCR.

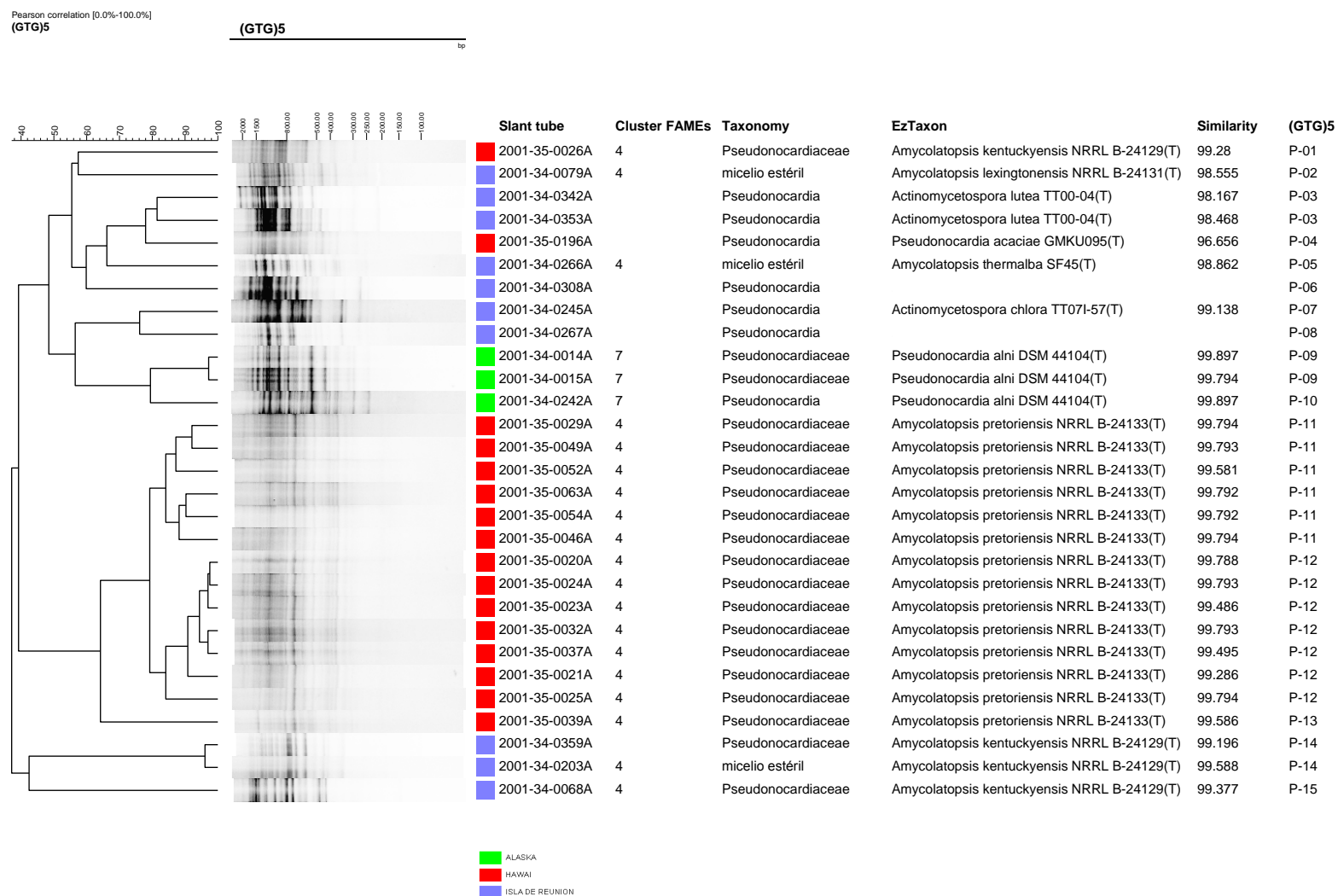
Las 31 cepas de la familia *Pseudonocardiaceae* estudiadas se agruparon en 19 *clusters* diferentes definidos a un punto de corte del 80% de similitud (**Figura 24**), 16 de ellos con una única cepa, 2 de ellos con 2 cepas y otro *cluster* formado por 11 cepas. Como ocurría con las dos técnicas de rep-PCR anteriores, este último *cluster* (*cluster* 16), junto con los *clusters* 14 y 15, forman un *cluster* mayor con 14 cepas asignadas a *Amycolatopsis pretoriensis*, aisladas todas ellas de Hawai. El otro *cluster* formado por 2 cepas es el *cluster* 12 con dos cepas clasificadas como *Pseudonocardia alni* aisladas de Alaska. Este *cluster* también lo hemos visto anteriormente con las dos técnicas precedentes, aunque en este caso la otra cepa de *Pseudonocardia alni* no se agrupa con las dos anteriores sino que queda muy alejada.

Figura 24: Dendrograma de las cepas de la familia *Pseudonocardiaceae* resultante del análisis de REP-PCR.

d.- (GTG)₅-PCR.

Los 30 cultivos de la familia *Pseudonocardiaceae* analizados mediante (GTG)₅-PCR se agruparon en 16 *clusters* diferentes definidos en el punto de corte habitual del 80% de similitud (**Figura 25**), 11 de ellos con una única cepa, 3 de ellos con 2 cepas y por último dos *clusters* formados por 6 (*cluster* 11) y 7 cepas (*cluster* 12) que forman a su vez un *cluster* mayor integrado, como viene siendo habitual, por cepas de *Amycolatopsis pretoriensis*, al que podría añadirse el *cluster* 13 formado por otra cepa de *A. pretoriensis*. Nuevamente, nos encontramos con los *clusters* 14 y 15 integrados por tres cepas de *Amycolatopsis kentuckyensis*, así como con los *clusters* 9 y 10 formados por tres cepas clasificadas como *Pseudonocardia alni* aisladas de Alaska o el *cluster* 3 con dos cepas de Reunión de *Actinomycetospora lutea*.

Figura 25: Dendrograma de las cepas de la familia *Pseudonocardiaceae* resultante del análisis de (GTG)₅-PCR.



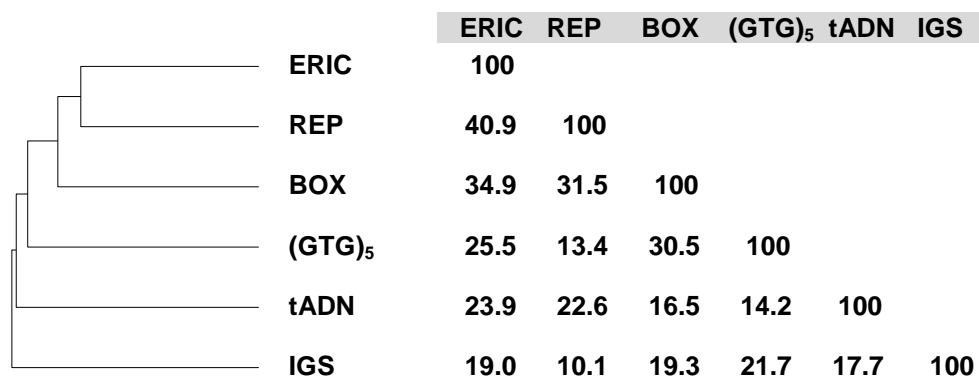
4.7. Comparación de técnicas basadas en perfiles de amplificación.

Siempre que se utilizan distintas técnicas para estudiar las relaciones existentes dentro de un grupo de organismos surge la pregunta sobre cómo de coincidentes son los resultados obtenidos con cada una de ellas, y si son comparables entre sí. Además, es interesante saber qué información hemos obtenido de cada técnica y el poder de discriminación entre cepas o la profundidad taxonómica de cada análisis empleado.

Una forma de conocer el grado de coherencia entre las técnicas es comparar las respectivas matrices de similitud obtenidas. Si representamos en un eje de coordenadas X-Y los correspondientes valores de similitud de dos técnicas distintas, podemos observar con facilidad el grado de concordancia entre ambas. Aprovechando la posibilidad que tiene BioNumerics de realizar este tipo de comparaciones hemos querido ver el grado de congruencia existente entre cada una de los diversos métodos basados en los perfiles de amplificación. El resultado de este análisis es una matriz con los valores de la congruencia existente entre cada una de las técnicas y un dendrograma resultante de dicha matriz que facilita la visualización e interpretación de la comparación. El método utilizado por defecto para calcular la congruencia entre dos experimentos es mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

El dendrograma y la matriz siguientes (**Figura 26**) muestran los valores de la congruencia existente entre las seis técnicas utilizadas basadas en perfiles de amplificación considerando todas las cepas estudiadas en su conjunto. Como vemos, empleando ERIC-PCR y REP-PCR se obtienen unos resultados más congruentes entre sí, junto con BOX-PCR. Las tres técnicas restantes están más alejadas y son las que ofrecen unos resultados menos congruentes entre sí y con las tres técnicas primeras.

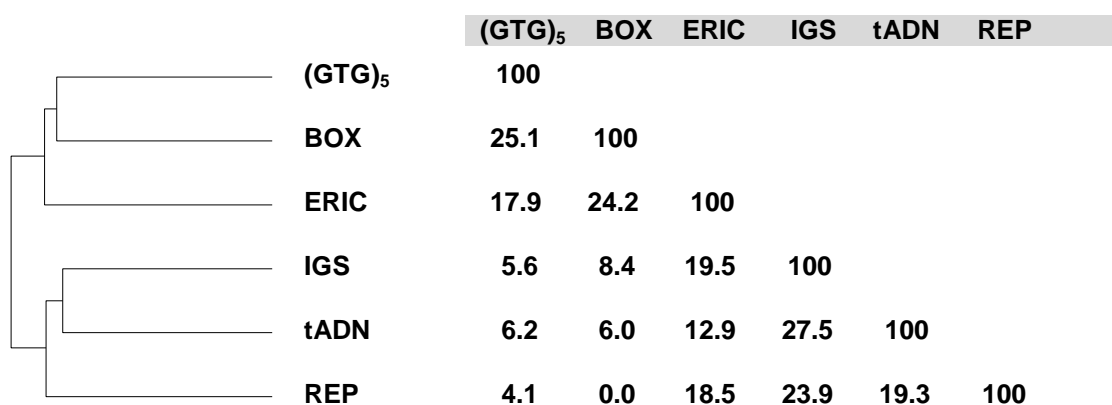
Figura 26: Matriz con los porcentajes de concordancia entre las técnicas empleadas para el conjunto de cepas estudiadas junto con el dendrograma resultante de dicha matriz.



Streptomyces

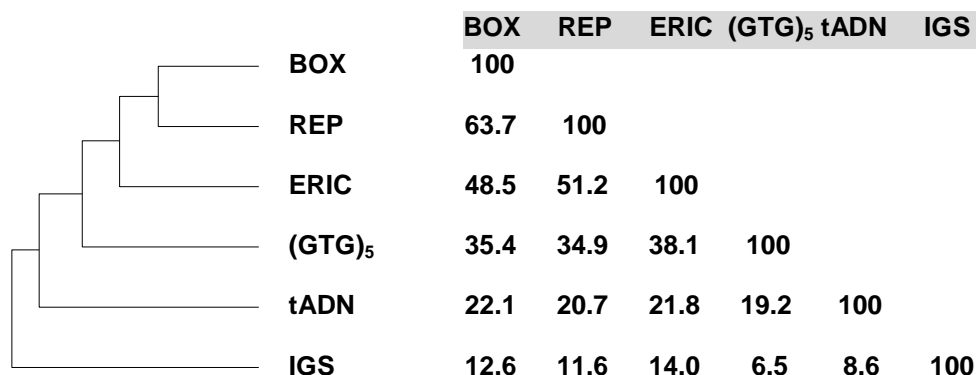
En el caso de las cepas del género *Streptomyces*, tenemos, según podemos ver en la matriz obtenida (**Figura 27**) que todos los porcentajes de similitud para cada par de técnicas son menores del 30%, indicando que existe muy poca o ninguna congruencia entre los resultados obtenidos con cada una de las técnicas. En cualquier caso, los mejores datos se tienen entre las técnicas de 16S-23S y tADN por un lado y entre BOX-PCR y (GTG)₅ por otro.

Figura 27: Matriz con los porcentajes de concordancia entre las técnicas empleadas para las cepas del género *Streptomyces* junto con el dendrograma resultante de dicha matriz.

*Micromonosporaceae*

El dendrograma y la matriz siguientes (**Figura 28**) muestran los valores de la congruencia existente entre cada una de las técnicas considerando las cepas de la familia *Micromonosporaceae*. Para estas cepas, las técnicas de BOX-PCR y REP-PCR son las que dan lugar a unos resultados más congruentes, seguidas de ERIC-PCR. Las tres técnicas restantes dan lugar a unos resultados menos comparables entre sí y con respecto a las tres técnicas primeras.

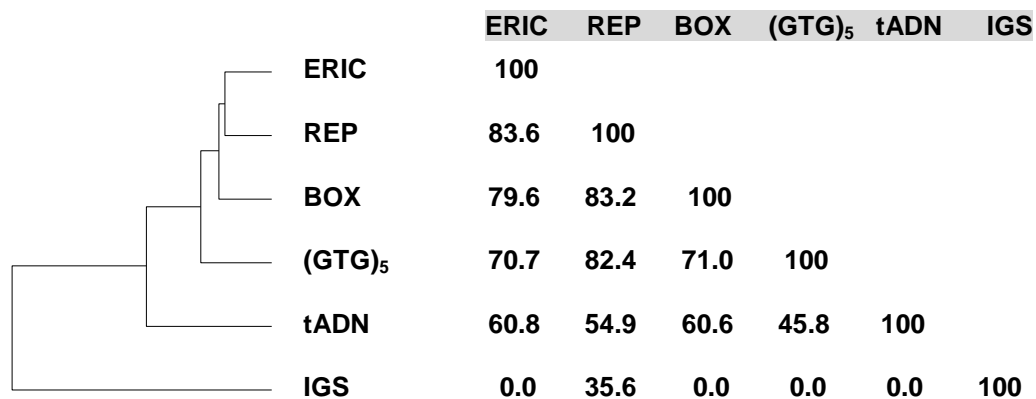
Figura 28: Matriz con los porcentajes de concordancia entre las técnicas empleadas para las cepas de la familia *Micromonosporaceae* junto con el dendrograma resultante de dicha matriz.



Pseudonocardiaceae

Por último, para las cepas de la familia *Pseudonocardiaceae*, vemos en el dendrograma y la matriz correspondientes (**Figura 29**) que las técnicas de ERIC-PCR y REP-PCR generan unos resultados comparables junto con las de BOX -PCR y, aunque algo más distante, la de (GTG)₅. Las dos técnicas restantes dan lugar a unos resultados menos comparables entre sí y con las tres técnicas primeras, especialmente la de 16S-23S, ya que en este caso, sólo un pequeño número de cepas de *Pseudonocardiaceae* pudo analizarse.

Figura 29: Matriz con los porcentajes de concordancia entre las técnicas empleadas para las cepas de la familia *Pseudonocardiaceae* junto con el dendrograma resultante de dicha matriz.



4.8. Estimación de la diversidad de las cepas según la técnica empleada.

Como ya comentamos en la *Introducción*, existen numerosos índices que permiten estudiar la diversidad de cepas presente en una población, y mediante esta forma poder determinar y comparar el poder de resolución de las distintas técnicas de caracterización empleadas. En este trabajo hemos calculado en primer lugar para cada método de caracterización molecular basado en perfiles de amplificación por PCR el número de cepas de cada taxón que podían analizarse con cada una de las técnicas usadas. Posteriormente, para los tres grupos taxonómicos mayoritarios (familias *Micromonosporaceae* y *Pseudonocardiaceae* y el género *Streptomyces*) se ha calculado la *riqueza* (S), el promedio del número de cepas esperado para cada OTU (N_e) y dos de los índices más utilizados actualmente, el índice de diversidad de Simpson (D) y el índice de Shannon-Weiner (H').

La mayoría de las aproximaciones empleadas para estimar la diversidad de una población requiere datos sobre las frecuencias relativas de las OTUs establecidas. Por tanto, para poder comparar las distintas técnicas empleadas por medio de la estimación de la diversidad, se requiere en primer lugar que se defina con claridad lo que es una OTU en cada tipo de análisis. Habitualmente una OTU se define al establecer un punto de corte en el porcentaje de similitud entre las cepas a partir del cual todas aquellas cepas que tengan un porcentaje mayor del punto de corte pertenecerán a la misma OTU. Siempre y cuando este punto de corte esté bien establecido y permanezca constante, la diversidad estimada será comparable y en consecuencia se podrán comparar los resultados obtenidos con las diversas técnicas (Hughes *et al.*, 2001).

En este trabajo, hemos establecido para todas las técnicas genómicas basadas en patrones de amplificación por PCR un punto de corte del 80% para definir una OTU, es decir, todas aquellas cepas que se agrupen con un porcentaje de similitud $> 80\%$ serán la misma OTU. Por nuestra experiencia previa consideramos que éste es un buen punto de corte para este tipo de técnicas. Además, diversos autores (Sadowsky *et al.*, 1996; Davelos *et al.*, 2004c; Lannot *et al.*, 2004; Bathe *et al.*, 2006) han utilizado este mismo punto de corte en sus estudios con cepas de *Streptomyces* utilizando la técnica de BOX-PCR. En el caso de cepas de *Micromonospora*, Alonso de la Vega (2010), estableció como punto de corte para establecer los clusters un 50% de similitud, valor basado en la reproducibilidad intrínseca para una de las cepas utilizada como control. Otros autores han empleado puntos de corte incluso mayores, hasta el 92% usando rep-PCR (Mohapatra *et al.*, 2007), pero hay que tener en cuenta que cuanto mayor sea el porcentaje de similitud fijado para establecer el punto de corte para definir una OTU, mayor será el número de OTUs obtenido, ya que aumentará el número de OTUs con una sola cepa.

Tabla 19: Porcentaje de cepas analizadas con cada una de las técnicas empleadas. En gris se destacan los porcentajes más altos de cepas analizadas.

Familia	Género	Cepas	FAMEs	BOX	ERIC	(GTG) ₅	REP	tADN	ITS
<i>Pseudonocardiaceae</i>	<i>Amycolatopsis</i>	23	95,6	91,3	91,3	87	91,3	91,3	0
	<i>Pseudonocardia</i>	8	62,5	75	62,5	75	75	50	12,5
	Indeterminado	5	20	80	80	80	60	0	80
	<i>Saccharothrix</i>	1	100	100	0	0	100	100	100
<i>Micromonosporaceae</i>	<i>Actinoplanes</i>	8	25	87,5	87,5	87,5	75	87,5	87,5
	<i>Micromonospora</i>	157	48,4	94,9	95,5	93,6	89,2	81,5	81,5
<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptomyces</i>	175	89,1	64	61,1	54,9	50,3	45,1	49,7
<i>Nocardiaceae</i>	<i>Gordonia</i>	4	100	75	75	50	50	75	0
	<i>Nocardia</i>	1	100	100	100	100	100	100	100
<i>Thermomonosporaceae</i>	<i>Actinomadura</i>	10	50	50	40	50	40	20	40
<i>Streptosporangiaceae</i>	<i>Planobispora</i>	1	0	100	100	0	100	0	100
	<i>Streptosporangium</i>	2	100	100	100	50	100	100	100
	Indeterminado	8	25	62,5	62,5	25	37,5	0	50
	TOTAL (%)	404	68,6	78,7	77	72,3	69,1	61,4	59,6
	Nº de cepas		277	318	311	292	279	248	241

Como podemos observar en la **Tabla 19**, en términos globales la técnica con la que pudimos analizar un mayor número de cepas es la de BOX-PCR seguida de ERIC-PCR, aunque si analizamos los resultados por grupos taxonómicos, vemos que hay diferencias claras en la capacidad de cada una de las técnicas. Podemos observar que para el género *Amycolatopsis* el número de cepas que se pueden analizar es muy parecido independientemente de la técnica usada, ya que el porcentaje de cepas analizadas por FAMEs es parecido a los de las técnicas de PCR-*fingerprinting* con la excepción de IGS-PCR, técnica con la que no se pudo analizar ninguna cepa de *Amycolatopsis*. También vemos que el porcentaje de cepas analizadas por (GTG)₅ es algo inferior al resto de técnicas de PCR-*fingerprinting*. En el caso de las 8 cepas de *Pseudonocardia* vemos que se analizan más cepas con técnicas de *fingerprinting* sobre todo con BOX-, REP- y (GTG)₅-PCR, mientras que el porcentaje de las analizadas con FAMEs es ligeramente inferior. Para las otras 5 cepas de la familia *Pseudonocardiaceae*, el porcentaje de las mismas que pudo analizarse con FAMEs fue muy bajo (20%) pero los porcentajes fueron muy superiores con BOX-, ERIC- y (GTG)₅-PCR (80%).

Con respecto a las cepas del género *Micromonospora*, el porcentaje de cepas analizadas con FAMEs fue muy bajo (48,4%) debido al limitado número de cepas de este género que es capaz de crecer en el medio TSBA, empleado para el análisis de ácidos grasos. Sin embargo, el porcentaje de cepas analizadas con técnicas de *fingerprinting* fue muy elevado, siendo las cepas de *Micromonospora* las que se analizaron en mayor porcentaje con estas técnicas con respecto a otras taxonomías. Estos porcentajes fueron especialmente altos para ERIC- (95,5%), BOX- (94,9%) y (GTG)₅-PCR (93,6%), seguidos de REP-PCR, tADN e IGS (89,2%, 81,5% y 81,5% respectivamente). Sin embargo, para las cepas de *Streptomyces*, el mayor porcentaje de cepas analizadas fue con FAMEs (89,1%)

gracias a la capacidad de crecimiento de este género en el medio TSBA, siendo, el porcentaje de cepas analizadas con técnicas de *fingerprinting* muy inferior al obtenido para las cepas de *Micromonospora*. En cualquier caso, el mayor porcentaje de cepas analizadas con técnicas de *fingerprinting* se obtuvo con BOX-PCR (64%) seguido de ERIC-PCR (61,1%).

En resumen, podemos decir que los resultados obtenidos son muy desiguales en función del grupo taxonómico analizado, siendo FAMEs una técnica que permite analizar un alto número de cepas de *Streptomyces* mientras que las técnicas de *fingerprinting* son los métodos más adecuados para analizar cepas de *Micromonospora*.

En la **Tabla 20** podemos ver el número de cepas analizado con cada técnica, junto con el número de OTUs o *riqueza* y el número de cepas promedio (N_e). En este caso vemos que el mayor número de OTUs y por tanto la mayor *riqueza* (S) se encuentra cuando empleamos la técnica de ERIC-PCR (209), seguido de (GTG)₅ (191), BOX-PCR (181) y REP-PCR (Davelos *et al.*, 2004b). En último lugar están las técnicas de tADN e IGS en donde el número de OTUs resultante es sólo de 99 y 55 respectivamente. Ahora bien, si tenemos en cuenta este resultado del valor de *riqueza* (S) junto con el número de cepas analizadas con cada técnica visto anteriormente, podemos calcular el número promedio de cepas en cada OTU, simplemente dividiendo el número total de cepas entre el número de OTUs (N_e) resultante de utilizar cada técnica con cada uno de los tres grupos mayoritarios. Aquí podemos ver que cuanto menor sea el valor de N_e mayor será la diversidad obtenida, ya que si N_e es 1 tendremos que todas las cepas aisladas pertenecen a distintas OTUs y que todas las OTUs tienen cepas singulares. El menor valor de N_e obtenido fue con la técnica de ERIC-PCR (1,41), seguido de (GTG)₅ (1,46), REP-PCR (1,52) y BOX-PCR (1,65). Como antes, los valores de N_e para las técnicas de tADN e IGS-PCR fueron los más altos (2,42 y 4,04 respectivamente) indicando que estas técnicas no tienen tanta resolución como las anteriores y no son capaces de distinguir con tanto detalle. Esto unido a que son las dos técnicas que menor número de cepas pueden analizar, las hacen menos convenientes que las de rep-PCR para distinguir entre cepas con un mayor grado de resolución.

Como en casos anteriores el valor de N_e para cada técnica depende del grupo taxonómico analizado. Por ejemplo, tenemos que para las cepas de *Streptomyces* el menor valor de N_e se obtiene con (GTG)₅ (1,08) seguido de ERIC-PCR (1,18), BOX-PCR (1,22) y REP-PCR (1,35). En general, tanto para las cepas de *Micromonospora* como de *Pseudonocardia* los valores de N_e son mayores, para cualquiera de las técnicas, que los correspondientes para *Streptomyces*. En concreto, para las cepas de *Micromonospora* estos valores fueron 1,55 (ERIC-PCR), 1,62 (REP-PCR), 1,77 ((GTG)₅) y 2,09 (BOX-PCR). En el caso de las cepas de *Pseudonocardia* estos valores fueron 1,63 (REP-PCR), 1,76 (ERIC-PCR), 1,93 ((GTG)₅) y 2,00 (BOX-PCR).

Finalmente, los últimos métodos que hemos usado para estimar la diversidad presente en nuestra población en función de la técnica aplicada fue calcular el índice de diversidad de Simpson (D) y el índice de Shannon-Weiner (H') con BioNumerics. En la **Tabla 21** podemos ver ambos índices para cada una de las técnicas empleadas y para

tanto para cada uno de los grupos taxonómicos analizados como para el conjunto de los tres grupos. Destacados en una escala de grises tenemos los tres mejores resultados obtenidos en cada caso.

En el caso del índice de Simpson, cuanto más cercano al 100% sea su valor, mayor diversidad presenta la población estudiada y en el caso del índice de Shannon-Weiner cuanto más cercano sea a 5 mayor diversidad tenemos. Para el conjunto de los tres grupos, el mayor valor del índice de Simpson lo encontramos cuando utilizamos la técnica de ERIC-PCR, seguida de (GTG)₅, aunque todas las técnicas de rep-PCR tienen un índice superior al 99%, mientras que para otras técnicas genómicas o FAMEs este índice es inferior, indicando una menor capacidad de estas técnicas para resolver entre cepas a niveles taxonómicos bajos. Analizando los resultados de este índice para cada grupo taxonómico, vemos que ERIC-PCR es la que da mayores valores para las cepas de *Micromonospora* y *Pseudonocardiaceae*, siendo REP-PCR y (GTG)₅ la segunda mejor para *Micromonospora* y *Pseudonocardiaceae* respectivamente. Sin embargo, para las cepas de *Streptomyces* la mejor técnica es (GTG)₅ seguida de ERIC- y BOX-PCR.

En cuanto al índice de Shannon-Weiner, los resultados son similares a los anteriores, obteniéndose los valores más altos para el conjunto de cepas con las técnicas de ERIC-PCR, seguida de (GTG)₅ con valores superiores a 5. Para cada grupo taxonómico, los resultados son también semejantes a los anteriores siendo ERIC-PCR el mayor para las cepas de *Micromonospora* y *Pseudonocardiaceae* y (GTG)₅ para las cepas de *Streptomyces* seguida de ERIC-PCR. En estos casos, los valores del índice de Shannon-Weiner son algo menores que para el conjunto, pero siempre en torno a 4,4, salvo en el caso de las cepas de *Pseudonocardiaceae* en donde este índice es claramente inferior.

Tabla 20: Estimación de la diversidad de las cepas para cada técnica empleada según el número de cepas analizado, junto con el número de OTUs o riqueza (S) y el número de cepas promedio esperado para cada OTU (N_e).

Taxonomía	ERIC			GTG5			REP			BOX			tADN			ITS			16S		
	cepas	OTUs (S)	N_e	cepas	OTUs (S)	N_e	cepas	OTUs (S)	N_e	cepas	OTUs (S)	N_e	cepas	OTUs (S)	N_e	cepas	OTUs (S)	N_e	cepas	OTUs (S)	N_e
<i>Micromonospora</i>	157	101	1,55	154	87	1,77	146	90	1,62	155	74	2,09	135	55	2,45	135	24	5,63	71	16	4,44
<i>Pseudonocardaceae</i>	30	17	1,76	29	15	1,93	31	19	1,63	32	16	2,00	26	7	3,71				33	12	2,75
<i>Streptomyces</i>	107	91	1,18	96	89	1,08	88	65	1,35	111	91	1,22	79	37	2,14	87	31	2,81	109	42	2,59
TOTAL	294	209	1,41	279	191	1,46	265	174	1,52	298	181	1,65	240	99	2,42	222	55	4,04	213	70	3,04

Tabla 21: Estimación de la diversidad de las cepas para cada técnica empleada según los índices de diversidad de Simpson (D) y de Shannon-Weiner (H). En gris oscuro se resalta el valor más alto de diversidad obtenido con cada técnica.

Taxonomía	Simpson (%)								Shannon-Weiner							
	BOX	ERIC	GTG5	REP	tADN	ITS	16S	FAMEs	BOX	ERIC	GTG5	REP	tADN	ITS	16S	FAMEs
<i>Micromonospora</i>	97,20	99,04	98,17	98,60	96,09	80,77	87,44	82,78	3,8820	4,3998	4,1306	4,2283	3,5808	2,1636	2,2851	2,0897
<i>Pseudonocardaceae</i>	83,47	92,41	91,03	87,74	56,92	86,67	77,65	70,75	2,2504	2,5459	2,4502	2,4937	1,2255	1,3297	1,8875	1,4247
<i>Streptomyces</i>	99,50	99,63	99,82	98,35	95,59	94,07	96,21	79,78	4,4322	4,4411	4,4578	3,9543	3,2481	3,0095	3,3970	2,1538
TOTAL	99,00	99,60	99,33	99,23	97,80	92,41	97,11	91,15	4,8610	5,1614	4,9979	4,8799	4,1463	3,2381	3,7905	2,9726

4.9. Detección de secuencias específicas de genes biosintéticos: sistemas PKS-I, PKS-II, NRPS, APH y HMG CoA reductasa.

Las sintasas modulares de poliquétidos (PKS-I) (Hopwood, 1997), las sintasas iterativas de poliquétidos (PKS-II) (Hopwood, 1997; Shen, 2003) y las sintetasas de péptidos no-ribosomales (NRPS) (Schwarzer *et al.*, 2003) son responsables de la síntesis en los actinomicetos de un amplio rango de metabolitos secundarios estructuralmente diversos. En menor medida, los actinomicetos son también productores de aminoglicósidos y compuestos isoprenoides con diferentes actividades biológicas (Walsh, 2003), pudiéndose detectar rutas relacionadas con estos compuestos usando oligonucleótidos para PCR dirigidos a genes de la fosfotransferasa de aminoglicósidos (APH) para detectar genes de resistencia asociados a estas rutas de biosíntesis (Huddleston *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 2002) así como oligonucleótidos para PCR diseñados para detectar la presencia de la reductasa 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG CoA) implicada en la ruta de biosíntesis de compuestos isoprenoides en actinomicetos (Sigmund *et al.*, 2003).

La presencia de secuencias de los genes biosintéticos PKS-I, PKS-II, NRPS, APH y HMG fue analizada en 338 cepas mediante la amplificación específica del ADN cromosómico con los cebadores K1F/M6R, KS α /KS β , A3F/A7R STRF/STRR y HMGF/HMGR, respectivamente (Tabla 22). En general, se obtuvieron altas frecuencias de amplificaciones positivas específicas para los sistemas biosintéticos PKS-I (62,4%), PKS-II (64,8%) y NRPS (58,3%). Por el contrario, la presencia de secuencias APH y HMG se detectó solamente en un 10,4% y un 3,6%, respectivamente, de las cepas estudiadas. Los porcentajes de detección de sistemas PKS-I, PKS-II y NRPS fue muy similar, aunque un análisis más detallado de los resultados permite observar diferencias en las tasas de detección según el grupo taxonómico y, dentro del mismo taxón, según su origen geográfico. Sin embargo, si no tenemos en cuenta la taxonomía de las cepas, los porcentajes de detección para los sistemas PKS-II, NRPS y APH son bastante similares con independencia del origen geográfico, aunque para los sistemas PKS-I y HMG sí se observan diferencias en los porcentajes según el origen geográfico (Tabla 22).

A continuación se describen, para las cepas de los géneros mayoritarios (*Amycolatopsis*, *Pseudonocardia*, *Micromonospora* y *Streptomyces*), la frecuencia de detección observados para cada sistema biosintético según la taxonomía de las cepas y sus orígenes geográficos. Para los otros géneros, no se pueden sacar conclusiones claras debido al pequeño número de cepas estudiadas, aunque es importante destacar que en todos los géneros se detectaron al menos dos de las tres rutas biosintéticas mayoritarias.

Detección de sistemas PKS-I.

La detección de genes asociados a sistemas PKS-I fue positiva en al menos una cepa de todos los géneros de actinomicetos ensayados exceptuando dos cepas pertenecientes al género *Gordonia* sp. El mayor porcentaje de detección de sistemas PKS-I se observó en las cepas del género *Amycolatopsis*, puesto que el 100% de las mismas dio un resultado positivo, tanto las cepas de Hawai como de Reunión. El 75,9% de las cepas

del género *Micromonospora* amplificaron positivamente aunque en este caso se observaron diferencias en los porcentajes de detección según el origen de las cepas: de las 6 cepas de Alaska ensayadas, en todas se detectó la presencia de sistemas PKS-I, mientras que en las de Hawai el porcentaje de detección fue del 66,7% y un 80,5% en el caso de las cepas de Reunión. El resultado fue también variable según el origen geográfico para las cepas de *Streptomyces* ya que los porcentajes de detección fueron del 20%, 52,5% y 45,3% para Alaska, Hawai y Reunión. Por último, en el caso de las 10 cepas de *Pseudonocardia* ensayadas, el porcentaje de detección fue muy variable según su origen ya que el 66,7% de las cepas de Alaska dieron un resultado positivo y un 20% en el caso de las de Reunión, mientras que en ninguna de las 2 cepas de Hawai se detectó la presencia de este sistema biosintético.

Detección de sistemas PKS-II.

La detección de genes asociados a sistemas PKS-II fue positiva en alguna cepa de todos los géneros ensayados. En este caso, las cepas de *Streptomyces* presentaron el mayor porcentaje de detección de sistemas PKS-II, observándose en un 68% de las cepas, aunque como en el caso de PKS-I, el porcentaje de detecciones varía según el origen. Sin embargo, la mayor proporción se encuentra entre las cepas de Reunión mientras que los de PKS-I se sitúa entre los de Hawai. Además, para los tres orígenes el porcentaje de detección es mayor que el respectivo para PKS-I. En el 62% de las cepas de *Micromonospora* se detectó la presencia de rutas PKS-II, aunque este porcentaje es inferior al que tenemos para PKS-I (75,9%). Para este género la proporción de cepas con este sistema fue del 83,3% de las cepas aisladas de Alaska, un 75,9% para las de Hawai y sólo un 50,7% para las de Reunión. En particular, llama la atención el caso de las cepas identificadas como *M. humi* aisladas de Reunión, ya que sólo en una de ellas se detecta la presencia de este sistema biosintético mientras que las 26 restantes no se encuentra este sistema. Sin embargo, las 27 cepas de *M. humi* de Reunión sí que dieron un resultado positivo en la detección de sistemas PKS-I. Para las cepas de *Amycolatopsis* y las de *Pseudonocardia*, los porcentajes de detección fueron 57,1% y 50% respectivamente, aunque la presencia de este sistema es distinto según el origen en ambos géneros. Para *Amycolatopsis*, el mayor porcentaje está entre las cepas de Hawai (66,7%) mientras que para *Pseudonocardia* está en las de Alaska (66,7%) y Reunión (60%).

Detección de sistemas NRPS.

La detección de genes asociados a sistemas NRPS se observó en la mayoría de los géneros salvo en la cepa de *Geodermatophilus*, la cepa de *Planobispora* y la cepa de *Saccharotrix*. Aunque el porcentaje de detección global y los de cada uno de los géneros para el sistema NRPS son algo menores que los encontrados para el sistema PKS-I, siguen sin embargo un paralelismo en cuanto a los géneros que presentan mayores porcentajes y dentro de cada género las mayores detecciones según su origen. Como en el caso de PKS-I, el mayor porcentaje se da entre las cepas de *Amycolatopsis* (95,2%) y las de *Micromonospora* (73,7%) para las que los mayores porcentajes se encuentran entre las cepas de Alaska y las de Reunión como ocurría con el sistema PKS-I. Un 50% de las cepas de *Pseudonocardia* presentan sistemas NRPS, siendo las de Alaska las que presentan

mayor porcentaje. Sólo en un 33,6% de las cepas de *Streptomyces* se detectó la presencia de sistemas NRPS, sin que hubiera en este caso diferencias claras en cuanto al origen de las cepas.

Detección de sistemas APH.

La presencia de secuencias APH es significativamente inferior a los valores detectados de las rutas biosintéticas PKS y NRPS para cada uno de los géneros estudiados. En este caso, sólo el 10,4% de las cepas tenía la ruta APH y sólo 6 de los 13 grupos taxonómicos evaluados presentaban alguna cepa con estas secuencias. Las cepas en las que se detectó este sistema con más frecuencia fueron las de la familia *Pseudonocardaceae*, sobre todo las del género *Amycolatopsis* con un porcentaje del 38,1% de las cepas y un 30% en las cepas del género *Pseudonocardia*. En contraste, las cepas del género *Micromonospora* dieron un resultado positivo en un 10,2% de los casos, siendo el porcentaje de detección incluso menor en las cepas de *Streptomyces*, con sólo un 5,7%.

Detección de sistemas HMG.

Finalmente, el último sistema estudiado fue la detección de la presencia de la reductasa 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG CoA). El gen HMG amplificó únicamente en el 3,5% de las cepas analizadas detectándose sólo en cepas aisladas de Hawai de *Streptomyces* y en cepas de *Micromonospora* de los tres orígenes pero en donde hay que destacar que el 66,7% de las cepas aisladas de Alaska, dieron un resultado positivo. En ningún otro grupo taxonómico estudiado, se detectó alguna cepa con esta secuencia.

Como resumen, podemos decir que en las cepas de *Streptomyces* se detecta mayor proporción de sistemas PKS-II (68%) seguido de sistemas PKS-I (46,7%) y de NRPS (33,6%). En el caso de las cepas de *Micromonospora*, los mayores porcentajes se observan para los sistemas PKS-I y NRPS (75,9 y 73,7% respectivamente) seguido del sistema PKS-II (62%). Para las cepas de *Amycolatopsis*, ocurre lo mismo que para las de *Micromonospora*, ya son los sistemas PKS-I y NRPS los más abundantes (100 y 95,2% respectivamente) siendo además los mayoritarios con independencia género.

Tabla 22: Número de cepas ensayadas y número de cepas en las que se detectan sistemas biosintéticos PKS-I, PKS-II, NRPS, APH y HMG.

Taxonomía	Nº cultivos ensayados				PKS-I				PKS-II			
	ALASKA	HAWAI	REUNION	TOTAL	ALASKA	HAWAI	REUNION	TOTAL	ALASKA	HAWAI	REUNION	TOTAL
<i>Actinomadura</i>	0	6	0	6	-	2	-	2	-	3	-	3
<i>Actinoplanes</i>	0	3	4	7	-	1	4	5	-	3	2	5
<i>Amycolatopsis</i>	0	15	6	21	-	15	6	21	-	10	2	12
<i>Geodermatophilus</i>	0	1	0	1	-	1	-	1	-	1	-	1
<i>Gordonia</i>	2	0	0	2	0	-	-	0	1	-	-	1
Indeterminado	0	6	21	27	-	1	12	13	-	5	14	19
<i>Micromonospora</i>	6	54	77	137	6	36	62	104	5	41	39	85
<i>Nocardia</i>	1	0	0	1	1	-	-	1	1	-	-	1
<i>Planobispora</i>	0	0	1	1	-	-	1	1	-	-	1	1
<i>Pseudonocardia</i>	3	2	5	10	2	0	1	3	2	0	3	5
<i>Saccharothrix</i>	0	1	0	1	-	1	-	1	-	1	-	1
<i>Streptomyces</i>	10	59	53	122	2	31	24	57	6	34	43	83
<i>Streptosporangium</i>	0	0	2	2	-	-	2	2	-	-	2	2
Total	22	147	169	338	11	88	112	211	15	98	106	219
Porcentaje					50	59.9	66.3	62.4	68.2	66.7	62.7	64.8

Taxonomía	NRPS				APH				HMG			
	ALASKA	HAWAI	REUNION	TOTAL	ALASKA	HAWAI	REUNION	TOTAL	ALASKA	HAWAI	REUNION	TOTAL
<i>Actinomadura</i>	-	2	-	2	-	0	-	0	-	0	-	0
<i>Actinoplanes</i>	-	3	3	6	-	0	1	1	-	0	0	0
<i>Amycolatopsis</i>	-	15	5	20	-	5	3	8	-	0	0	0
<i>Geodermatophilus</i>	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0
<i>Gordonia</i>	1	-	-	1	0	-	-	0	0	-	-	0
Indeterminado	-	4	14	18	-	1	1	2	-	0	0	0
<i>Micromonospora</i>	6	34	61	101	0	5	9	14	4	2	1	7
<i>Nocardia</i>	1	-	-	1	0	-	-	0	0	-	-	0
<i>Planobispora</i>	-	-	0	0	-	-	0	0	-	-	0	0
<i>Pseudonocardia</i>	2	0	3	5	2	0	1	3	0	0	0	0
<i>Saccharothrix</i>	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0
<i>Streptomyces</i>	3	22	16	41	0	7	0	7	0	5	0	5
<i>Streptosporangium</i>	-	-	2	2	-	-	0	0	-	-	0	0
Total	13	80	104	197	2	18	15	35	4	7	1	12
Porcentaje	59.1	54.4	61.5	58.3	9.1	12.2	8.9	10.4	18.2	4.8	0.6	3.5

4.9.1. Perfiles de digestión con la enzima *Hin F1* de los productos de amplificación de los sistemas PKS-I, PKS-II y NRPS.

Como hemos visto, existen diversos métodos de *fingerprinting* molecular para desreplicar entre cepas salvajes basados en la amplificación, al azar o específica, por PCR de distintas regiones del ADN genómico. Estos métodos son capaces de discriminar entre cepas hasta niveles infraespecíficos. Sin embargo, la capacidad para producir metabolitos secundarios no tiene porqué estar ligada a miembros de categorías taxonómicas infraespecíficas (Bull *et al.*, 2000). Así pues, si integramos tanto la información resultante de la detección de secuencias PKS-I, PKS-II y NRPS como la la diversidad de dichas secuencias, junto con la información obtenida sobre la diversidad taxonómica permitiría optimizar el proceso de desreplicación y selección de las cepas salvajes aisladas.

Considerando la premisa anterior, y con objeto de evaluar la diversidad de los productos amplificados y, de forma indirecta de los *clusters* biosintéticos correspondientes en indirectamente el potencial metabólico para producir compuestos sintetizados por sistemas PKS-I, PKS-II y NRPS dentro de los grupos de cepas salvajes mayoritarios, se llevaron a cabo digestiones de los productos de amplificación obtenidos con las parejas de oligonucleótidos específicos para cada una de las tres rutas utilizando la enzima de restricción *HinF1*. Para cada uno de los tres grupos taxonómicos mayoritarios hicimos, como primer paso, un análisis de *clusters* para cada una de las tres digestiones individuales. Posteriormente, en un segundo paso, llevamos a cabo un análisis de *clusters* calculando una matriz de similitud promediada a partir de la combinación de las tres matrices de similitud individuales anteriores y a partir de esta nueva matriz generada poder construir el correspondiente dendrograma (Manual Bionumerics® versión 5.1).

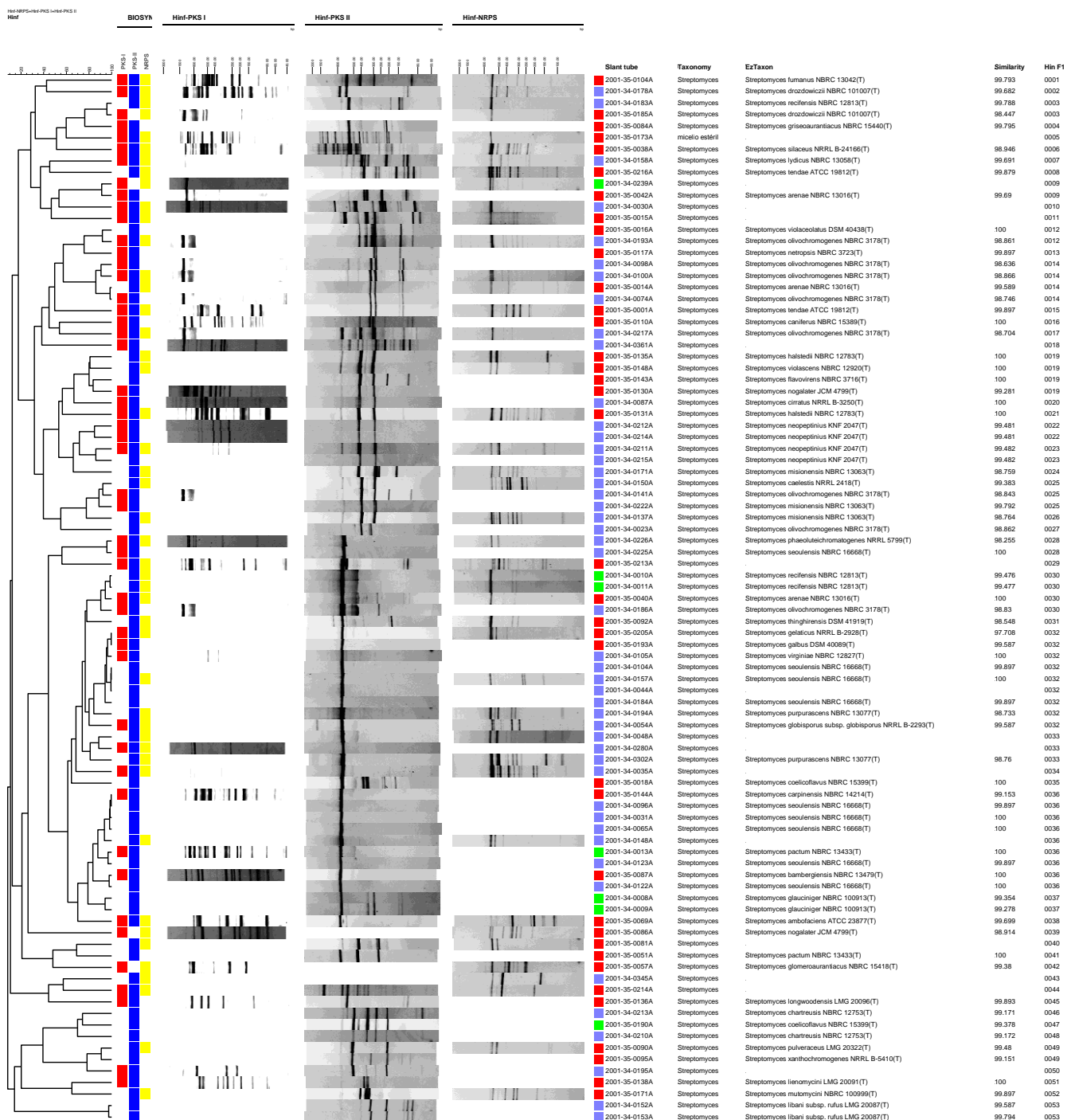
Los resultados obtenidos a partir del dendrograma compuesto para cada uno de los grupos mayoritarios fueron los siguientes:

Streptomyces

En la **Figura 30** tenemos el dendrograma resultante de la combinación de los tres perfiles de restricción de las 91 cepas del género *Streptomyces* que habían dado un resultado positivo con alguno de los sistemas PKS-I, PKS-II y NRPS. Para un punto de corte del 80 % de similitud, se obtuvieron 53 grupos diferentes de cepas, con 37 de las 91 cepas con una combinación de sus perfiles de restricción únicos. Sin embargo, existen otras 54 cepas que se agrupan en 16 *clusters* diferentes, conteniendo cada uno de estos clusters entre 2 y 9 cepas con una combinación de perfiles de restricción muy semejante. En el caso de las cepas de *Streptomyces* no parece que haya una correlación clara entre los perfiles metabólicos y la taxonomía de las cepas ya que cepas con la misma identificación según la secuencia del gen ribosomal 16S se reparten en varios *clusters*, con lo que tendrían un potencial diferente, y por otro lado, dentro del mismo *cluster* encontramos cepas con taxonomías diferentes pero que tendrían un potencial metabólico similar. Sin embargo, también podemos encontrar casos de *clusters* que agrupan cepas con la misma identificación taxonómica.

Podemos observar en el dendrograma que 11 de los 16 *clusters* con más de una cepa son heterogéneos en cuanto a la taxonomía de las cepas que agrupan ya que tienen distintas taxonomías pero también encontramos 4 *clusters* que sí incluyen únicamente cepas con la misma taxonomía como son los *clusters* 22 y 23 que contienen 2 cepas cada uno de *S. neopeptinius* aisladas de Reunión; el *cluster* 37 agrupa 2 cepas de *S. glauciniger* aisladas de Alaska; y el *cluster* 53 que está formado por 2 cepas de *S. libani* subsp. *rufus* procedentes de Reunión. Finalmente, encontramos cepas con la misma taxonomía dentro de *clusters* que incluyen además otras cepas con otras taxonomías, como son los casos de cinco cepas de *S. olivochromogenes* localizadas en los *clusters* 12 al 17 que están acompañadas de otras cinco cepas con distinta taxonomía; el *cluster* 30 integrado por dos cepas de *S. recifensis* aisladas de Alaska junto con una tercera cepa; el *cluster* 32, formado por 9 cepas entre las que se incluyen 3 cepas de *S. seoulensis* así como el *cluster* 36, formado también por 9 cepas pero en este caso incluyendo 5 cepas de *S. seoulensis*.

Figura 30: Dendrograma resultante de la combinación de los tres perfiles de restricción con la enzima *Hin* F1 de las cepas de *Streptomyces*.

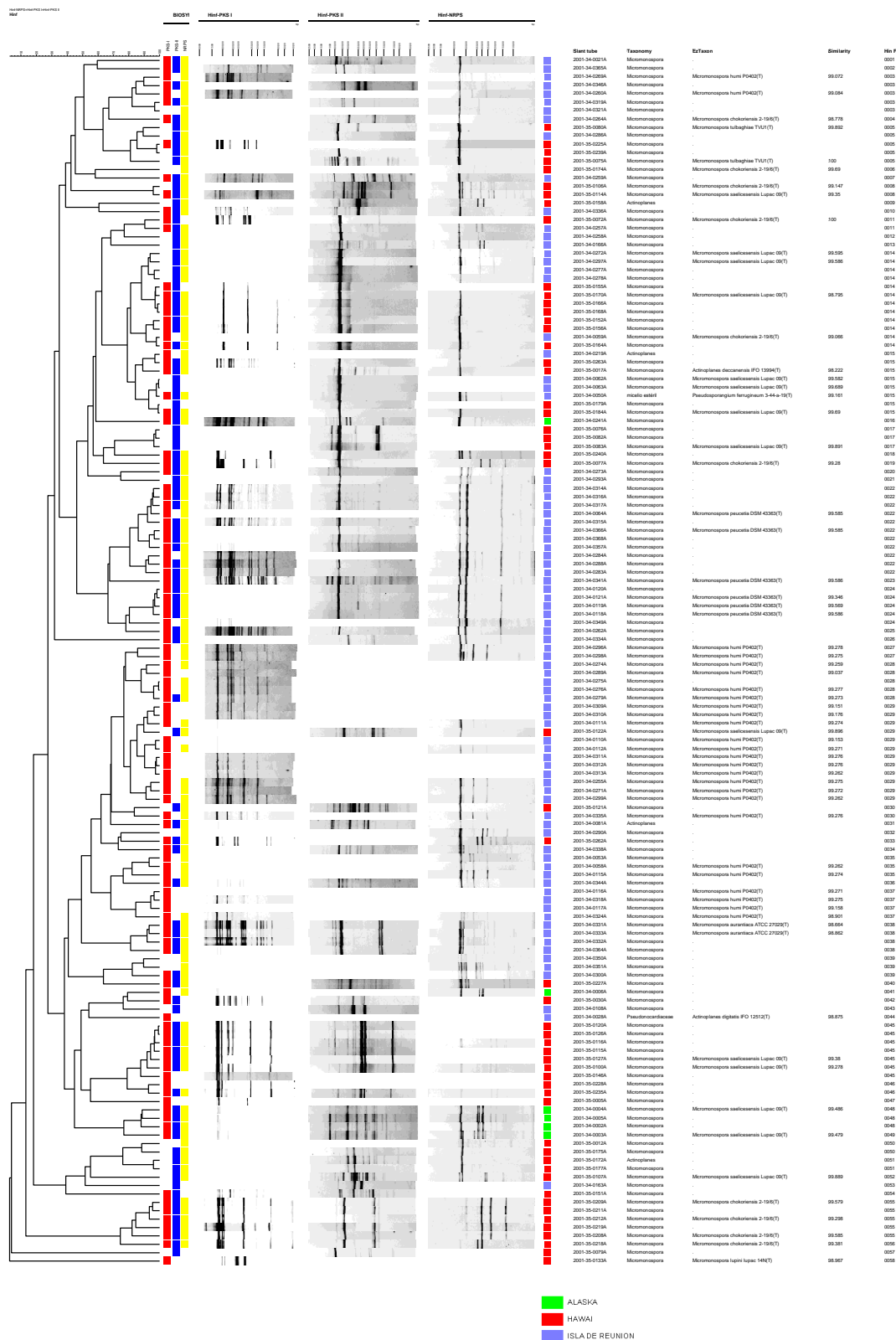


Micromonosporaceae

En la **Figura 31** tenemos el dendrograma resultante de la combinación de los tres perfiles de restricción de las 144 cepas de la familia *Micromonosporaceae* que habían dado un resultado positivo con alguno de los sistemas PKS-I, PKS-II y NRPS. Para un punto de corte en el 80 % de similitud, se obtuvieron 58 grupos diferentes de cepas, con 35 de las 144 cepas con una combinación de sus perfiles de restricción únicos. Sin embargo, existen 109 cepas que se agrupan en 23 *clusters* diferentes, conteniendo cada uno de estos *clusters* entre 2 y 12 cepas cuya combinación de perfiles de restricción es muy semejante. Por tanto, podría considerarse que los integrantes de cada uno de estos 23 *clusters* tienen un potencial metabólico similar ya que contendrían secuencias de diferentes rutas metabólicas idénticas o muy parecidas. Además, podemos observar que la correlación entre el potencial metabólico y la taxonomía de las cepas no es clara ya que encontramos cepas con la misma identificación según la secuencia del gen ribosomal 16S que se reparten en varios *clusters*, aunque a la vez podemos ver cepas con la misma taxonomía agrupadas dentro del mismo *clusters* o en *clusters* cercanos.

Este es el caso de las 14 cepas de *Micromonospora saelicesensis* que están repartidas en 9 *clusters* distintos, aunque 6 de ellas se encuentran en los *clusters* 14 y 15 junto con otras 11 cepas sin identificar y otras 3 con diferentes taxonomías. Lo mismo ocurre con las 9 cepas de *M. chokoriensis* que están repartidas en 8 *clusters* distintos, aunque también podemos encontrar 4 de estas cepas en los *clusters* 55 y 56 junto con otras dos cepas sin identificar. De las 26 cepas de *M. humi* de Reunión, 24 de ellas se encuentran en los *clusters* 27 al 37, junto con otras 8 cepas sin identificar y otra cepa con otra taxonomía. Las 6 cepas de *M. peucetia* se localizan en los *clusters* 22 al 25 junto con otras 12 cepas sin identificar. Finalmente, nos encontramos con *clusters* que incluyen cepas con la misma taxonomía como las dos cepas de *Micromonospora tulbaghiae* que se agrupan en el *cluster* 5 junto a otras tres cepas sin identificar o el *cluster* 38 formado por las dos cepas de *Micromonospora aurantiaca* y otras dos cepas sin identificar.

Figura 31: Dendrograma resultante de la combinación de los tres perfiles de restricción con la enzima *Hin* F1 de las cepas de la familia *Micromonosporaceae*.

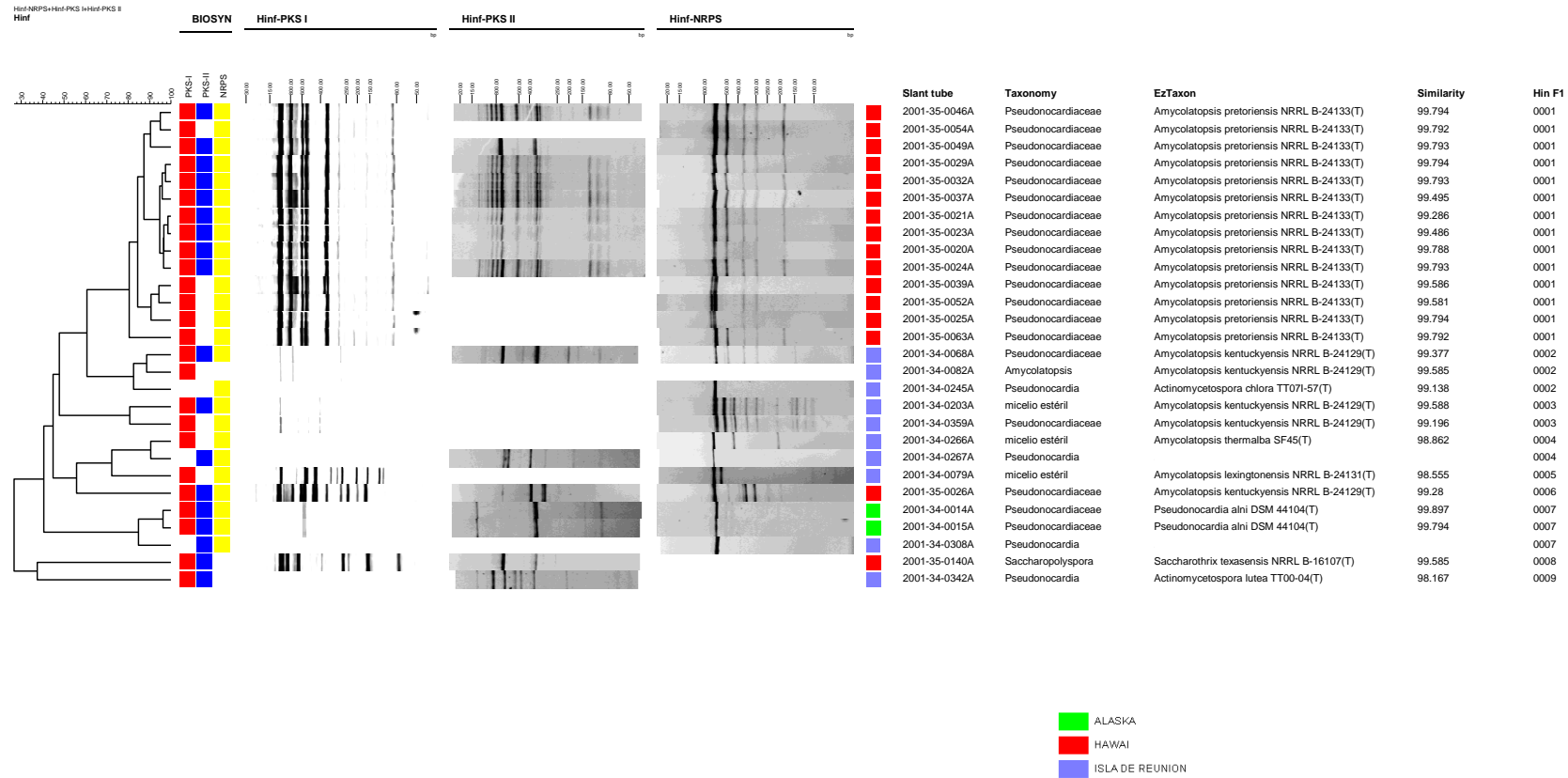


Pseudonocardiaceae

Los productos de amplificación de las 28 cepas de la familia *Pseudonocardiaceae* que habían dado un resultado positivo con alguno de los sistemas PKS-I, PKS-II y NRPS, se digirieron con la enzima *Hin* F1 y los perfiles de restricción respectivos se integraron en un único dendrograma como en los grupos anteriores ([Figura 32](#)). Estableciendo como punto de corte un 80 % de similitud, se obtuvieron 9 *clusters* diferentes, con 4 de las 28 cepas con una combinación de sus perfiles de restricción únicos. Las 24 cepas restantes estaban agrupadas en los otros 5 *clusters*, conteniendo cada uno entre 2 y 14 cepas con combinaciones de perfiles de restricción muy semejantes. Podemos considerar que los integrantes de estos *clusters* podrían tener un potencial metabólico similar ya que contendrían secuencias de diferentes rutas metabólicas idénticas o muy parecidas. En el caso de los miembros de la familia *Pseudonocardiaceae*, al contrario de lo que ocurría en el caso de la familia *Micromonosporaceae*, podemos observar que sí parece haber una correlación entre el potencial metabólico y la taxonomía de las cepas ya que los *clusters* formados están integrados generalmente por cepas con la misma taxonomía, con lo que tendrían un capacidad de síntesis de metabolitos secundarios similar. Sólo en el caso del *cluster* 2, encontramos cepas con 2 taxonomías diferentes (2 cepas de *Amycolatopsis kentuckyensis* y una de *Actinomyces sp. chlora*), aunque podrían tener un potencial metabólico parecido.

El *cluster* mayor, es el *cluster* 1 que contiene 14 cepas de *Amycolatopsis pretoriensis* aisladas de Hawai. En este caso tendríamos cultivos que serían distintos especímenes de la misma cepa con un potencial similar para producir metabolitos secundarios. El *cluster* 3 también contiene 2 cepas de *Amycolatopsis kentuckyensis* aisladas de Reunión. El *cluster* 4 está formado por dos cepas de Reunión, una sin identificar y otra identificada como *Amycolatopsis thermalba*. El *cluster* 7 está formado por tres cepas, una de Reunión sin identificar y 2 de Alaska identificadas como *Pseudonocardia alni*.

Figura 32: Dendrograma resultante de la combinación de los tres perfiles de restricción con la enzima *Hin* F1 de las cepas de la familia *Pseudonocardiaceae*.



4.10. Evaluación de actividades antimicrobianas (antibacterianas y antifúngicas).

Con el fin de evaluar el potencial de nuestra población de actinomicetos para producir actividades antimicrobianas, tanto antibacterianas como antifúngicas, estudiamos la capacidad de las cepas de actinomicetos para inhibir el crecimiento de dos bacterias (*S. aureus* y *E. coli*) y una levadura (*C. tropicalis*) en ensayos de difusión en agar. La actividad antimicrobiana es un indicador de la capacidad de producción de metabolitos secundarios bioactivos con un potencial interés terapéutico (Suay *et al.*, 2000). El ensayo consistió en la colocación de un taco de agar de cada una de las 400 cepas crecidas en medio sólido sobre un césped de cada uno de los microorganismos diana, dejando que difundieran los metabolitos secundarios producidos y midiendo los halos de inhibición observados tras una noche de incubación.

Un 27% de las cepas producen algún tipo de actividad antimicrobiana (Tabla 23). Al menos 7 de los 13 taxones presentaron algún tipo de actividad antimicrobiana, siendo las actividades frente a *S. aureus* las más frecuentes (21,8%), seguidas de las actividades antifúngicas frente a *C. tropicalis* con un 11,3% de cepas activas. Por último, las actividades contra *E. coli* fueron las menos abundantes con un 6,5% de cepas activas.

Es importante señalar que representantes de las distintas familias y géneros presentaron marcadas diferencias en su capacidad para producir actividades antimicrobianas (Tabla 23), al igual que respecto al origen geográfico entre las cepas aisladas de zonas frías y las aisladas de zonas tropicales.

En cuanto a las diferencias observadas en las distintas taxonomías, el grupo más productivo corresponde a los miembros del género *Amycolatopsis* con un 84,6% de cepas activas, que es además, el grupo que presenta unas tasas de detección más altas para genes asociados a rutas bioactivas. El 40,4% de las cepas pertenecientes al género *Streptomyces* tienen actividad antimicrobiana frente al menos una de las cepas ensayadas. Este resultado contrasta con el hecho de que el 80% de estas cepas presentaba al menos un tipo de ruta biosintética. Por el contrario, también llama la atención que sólo 7 de las 142 cepas del género *Micromonospora* mostraron algún tipo de actividad, no correspondiéndose con la riqueza de secuencias biosintéticas observada para este grupo de actinomicetos. Finalmente, las actividades observadas entre los taxones minoritarios fueron muy variables y, probablemente, no significativos debido al pequeño número de cepas ensayadas. Además, ninguna actividad se detectó en el caso de cepas de los géneros *Geodermatophilus*, *Gordonia*, *Nocardia*, *Planobispora*, *Pseudonocardia* y *Saccharotrix*.

También se observaron diferencias muy significativas en la capacidad para producir actividades antimicrobianas en las cepas según el origen geográfico. En el caso de las cepas aisladas tanto de Hawai como de Reunión, los resultados globales fueron muy similares, aunque se pudieron detectar algunas diferencias en algunos géneros. Por ejemplo, ninguna de las cepas de *Amycolatopsis* aisladas de Hawai fue activa frente a *E. coli*, o el caso de las cepas de *Micromonospora*, también aisladas de Hawai, que no produjeron ninguna actividad frente a ninguna de las tres cepas diana, mientras que entre

las aisladas de Reunión sí que se observaron actividades contra las tres cepas de ensayo. El comportamiento de las cepas de *Streptomyces*, tanto las aisladas de Hawai como las de Reunión fue similar, con porcentajes de inhibición frente a *S. aureus* muy parecidos (33,8% y 32,1%, respectivamente), ligeramente superiores frente a *E. coli* en las cepas de Hawai (16,9% frente a 10,7% de Reunión) y significativamente más altas frente a *C. tropicalis* en las cepas de Hawai (25,4% frente a 16,7% de Reunión). En cuanto a las cepas aisladas de Alaska, sólo las cepas de *Streptomyces* produjeron algún tipo de actividad, siendo en cualquier caso el porcentaje de actividad (9,1%) muy inferior al observado en las cepas de Hawai y Reunión.

Tabla 23: Actividades antimicrobianas detectadas en función de la taxonomía de los cultivos para cada cepa de ensayo (*Staphylococcus aureus* (MB 5393), *Escherichia coli* (MB 4926) y *Candida tropicalis* (MY 1012)) y según su origen geográfico.

Taxonomía	ALASKA					HAWAI					REUNION					TOTAL				
	Cepas ensayadas	activos	S. aureus	E. coli	C. tropicalis	Cepas ensayadas	activos	S. aureus	E. coli	C. tropicalis	Cepas ensayadas	activos	S. aureus	E. coli	C. tropicalis	Cepas ensayadas	activos	S. aureus	E. coli	C. tropicalis
<i>Actinomadura</i>						10	3	2	1	2						10	3	2	1	2
<i>Actinoplanes</i>						3	0	0	0	0	5	2	2	0	0	8	2	2	0	0
<i>Amycolatopsis</i>						17	15	15	0	0	9	7	6	2	3	26	22	21	2	3
<i>Geodermatophilus</i>						1	0	0	0	0						1	0	0	0	0
<i>Gordonia</i>	3	0	0	0	0											3	0	0	0	0
Indeterminado						6	0	0	0	0	21	6	3	0	5	27	6	3	0	5
<i>Micromonospora</i>	6	0	0	0	0	58	0	0	0	0	78	7	7	2	1	142	7	7	2	1
<i>Nocardia</i>	1	0	0	0	0											1	0	0	0	0
<i>Planobispora</i>											1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
<i>Pseudonocardia</i>	5	0	0	0	0	2	0	0	0	0	5	0	0	0	0	12	0	0	0	0
<i>Saccharothrix</i>						1	0	0	0	0						1	0	0	0	0
<i>Streptomyces</i>	11	1	1	0	1	71	31	24	12	18	84	35	27	9	14	166	67	52	21	33
<i>Streptosporangium</i>											2	1	0	0	1	2	1	0	0	1
Total	26	1	1	0	1	169	49	41	13	20	205	58	45	13	24	400	108	87	26	45
Porcentaje		3.85	3.85	0	3.85		28.99	24.26	7.69	11.83		28.29	21.95	6.34	11.71		27	21.75	6.5	11.25

4.11. Relación entre la presencia de sistemas PKS y NRPS y actividad antimicrobiana en cepas salvajes de actinomicetos.

Una vez analizada la capacidad de producción de actividades antimicrobianas de la población de actinomicetos, así como la presencia de sistemas biosintéticos, quisimos estudiar la posible relación entre ambos resultados, especialmente entre la presencia de sistemas PKS y NRPS y la síntesis de productos bioactivos en nuestra población de cepas salvajes. Con este propósito, la población de cepas se dividió en dos grupos en base a los resultados obtenidos en los ensayos de actividad antimicrobiana. Uno de los grupos contiene aquellas cepas con actividad antimicrobiana en, al menos, uno de los tres ensayos, y el otro grupo, está integrado por aquellas cepas sin ningún tipo de actividad antimicrobiana. A continuación se analizaron los resultados derivados de la detección de sistemas biosintéticos en cada uno de estos dos grupos y para cada uno de los tres grupos taxonómicos principales caracterizados dentro de la población de cepas salvajes (*Amycolatopsis*, *Micromonospora* y *Streptomyces*) para finalmente, comparar los resultados derivados de ambos tipos de estudios.

En términos generales, podemos ver que la presencia de sistemas biosintéticos es similar tanto entre las cepas activas como las inactivas, aunque sí se observan algunas diferencias en algunos sistemas y a pesar de la gran diferencia que existe en la proporción de cultivos inactivos (73,1%) frente a la de activos (26,9%). En los sistemas PKS-II y STR, los porcentajes son superiores entre los activos que entre las cepas inactivas (70,3% y 62,8% para PKS-II y 14,3% y 8,9% para STR, entre activos e inactivos respectivamente), lo que podría indicar que sí hay cierta correlación entre las actividades detectadas y la presencia de estos sistemas. Sin embargo, en el caso de sistemas NRPS, ocurre al contrario que en los casos anteriores, donde se observa un menor porcentaje entre los activos (47,3%) que entre los inactivos (62,3%). Por último, los porcentajes de detección del sistema PKS-I son muy similares tanto entre los cultivos activos (63,7%) como los inactivos (61,9%).

Aunque, como dijimos previamente, en términos globales no hay grandes diferencias entre las cepas activas e inactivas en cuanto a la presencia de sistemas biosintéticos, sí que existen diferencias significativas en algunos grupos taxonómicos que hay que destacar. El género *Amycolatopsis* es el grupo taxonómico que presentaba la mayor proporción de actividades antimicrobianas (85,7%) siendo además el grupo que tenía la mayores frecuencias de detección de sistemas biosintéticos ([Tabla 24](#)). Sin embargo, prácticamente no hay diferencias en la presencia de sistemas biosintéticos entre los cultivos activos y los inactivos, salvo en el caso del sistema PKS-II que no se detecta en ningún caso entre los cultivos inactivos y sí se detecta en el 66,7% de los cultivos activos.

Dentro del género *Micromonospora*, contrasta el alto porcentaje de sistemas biosintéticos detectados con el bajo número de cepas activas (5,1%). A pesar de esto, cabe destacar que la frecuencia de sistemas biosintéticos es muy alta, tanto entre las cepas activas como las inactivas, aunque existen diferencias particulares entre ambos grupos. Por ejemplo, la presencia de sistemas PKS-I es menor entre los activos (57,1%) que entre los

inactivos (76,9%) pero sí se detecta entre los cultivos activos mayor presencia de sistemas biosintéticos tipo PKS-II, NRPS y STR (85,7%, 85,7% y 28,6%) que entre los inactivos (60,8%, 73,1% y 9,2%).

Finalmente, para el género *Streptomyces*, las frecuencias de detección de sistemas PKS-I fueron muy similares entre las cepas activas (46,3%) y las inactivas (47,1%), así como para el sistema STR (5,6% y 5,9% respectivamente). Para el caso del sistema PKS-II, sí vemos que el porcentaje de cultivos con este sistema es mayor entre los activos (70,4%) que entre los inactivos (66,2%), aunque esta diferencia no parece significativa. Sin embargo, llama la atención el que la frecuencia de detección de sistemas NRPS entre los activos (24,1%) sea muy inferior a la observada entre los cultivos inactivos (41,2%), cuando en principio parecería más lógico esperar el caso contrario.

Tabla 24: Detección de sistemas biosintéticos en la población de actinomicetos agrupados según su capacidad para producir actividades antimicrobianas. Las cepas se han dividido en dos grupos: activos, con actividad en al menos uno de los ensayos de actividad antimicrobiana, e inactivos. En gris se han destacado los valores más reseñables.

Taxonomía	nº de cepas	nº de activos		PKS-I		PKS-II		NRPS		APH		HMG		nº de inactivos		PKS-I		PKS-II		NRPS		APH		HMG	
		nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
<i>Actinomadura</i>	6	3	50	2	66.7	2	66.7	1	33.3	0	0	0	0	3	50	0	0	1	33.3	1	33.3	0	0	0	0
<i>Actinoplanes</i>	7	2	28.6	2	100	1	50	1	50	0	0	0	0	5	71.4	3	60	4	80	5	100	1	20	0	0
<i>Amycolatopsis</i>	21	18	85.7	18	100	12	66.7	17	94.4	7	38.9	0	0	3	14.3	3	100	0	0	3	100	1	33.3	0	0
<i>Geodermatophilus</i>	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100	1	100	1	100	0	0	0	0	0	0
<i>Gordonia</i>	2	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	100	0	0	1	50	1	50	0	0	0	0
Indeterminado	27	6	22.2	6	100	4	66.7	4	66.7	1	16.7	0	0	21	77.8	7	33.3	15	71.4	14	66.7	1	4.8	0	0
<i>Micromonospora</i>	137	7	5.1	4	57.1	6	85.7	6	85.7	2	28.6	0	0	130	94.9	100	76.9	79	60.8	95	73.1	12	9.2	7	5.4
<i>Nocardia</i>	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100	1	100	1	100	1	100	0	0	0	0
<i>Planobispora</i>	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100	1	100	1	100	0	0	0	0	0	0
<i>Pseudonocardia</i>	10	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10	100	3	30	5	50	5	50	3	30	0	0
<i>Saccharothrix</i>	1	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	100	1	100	1	100	0	0	0	0	0	0
<i>Streptomyces</i>	122	54	44.3	25	46.3	38	70.4	13	24.1	3	5.6	0	0	68	55.7	32	47.1	45	66.2	28	41.2	4	5.9	5	7.4
<i>Streptosporangium</i>	2	1	50	1	100	1	100	1	100	0	0	0	0	1	50	1	100	1	100	1	100	0	0	0	0
Total	338	91	26.9	58	63.7	64	70.3	43	47.3	13	14.3	0	0	247	73.1	153	61.9	155	62.8	154	62.3	22	8.9	12	4.9

4.12. Producción de metabolitos secundarios.

4.12.1. Microfermentación de cepas de la familia *Pseudonocardiaceae*.

En vista de los resultados obtenidos con las cepas de la familia *Pseudonocardiaceae*, por un lado en cuanto al elevado número de actividades detectadas inicialmente en el ensayo de difusión en agar, en el que 22 de las 39 cepas ensayadas presentaron alguna actividad (56,4%) frente a alguna de las tres cepas diana utilizadas, y por otro lado con respecto al alto número de rutas biosintéticas tipo PKS-I, PKS-II o NRPS detectadas en estas cepas, en donde 28 de las 32 cepas analizadas (87,5%) presentaban al menos uno de estos sistemas biosintéticos, decidimos estudiar con más detalle estos resultados analizando el potencial metabólico de algunas de estas cepas, a partir de extractos de cultivos en medios líquidos y sólidos mediante la detección de actividades antimicrobianas y el análisis por cromatografía líquida y espectrometría de masas (LC/MS) con el fin de determinar si producían algún metabolito conocido. En cualquier caso, hay que mencionar que el elevado número inicial de actividades así como la detección de la presencia de diversas rutas biosintéticas podrían deberse claramente al hecho de que varias de las cepas podrían ser en realidad distintos clones de la misma cepa, como parece ser el caso en varias de las cepas de *Amycolatopsis pretoriensis* NRRL B-24133. Precisamente y por esta misma razón, un estudio más detallado a nivel metabólico podría aclarar si realmente cepas que son fenotípica y genotípicamente iguales son capaces de producir distintos metabolitos y distintas actividades antimicrobianas, o si por el contrario producen todas ellas los mismos metabolitos y actividades.

Para ello, seleccionamos 32 cepas de la familia *Pseudonocardiaceae* que cultivamos por duplicado en cuarenta condiciones de fermentación distintas. Las condiciones de fermentación seleccionadas incluían medios de cultivo en medio sólido que trataban de reproducir las condiciones originales en los ensayos de inhibición con los tacos de agar, así como cultivos en medios líquidos. Todas las fermentaciones se realizaron en un formato miniaturizado en placas multipocillo de 96 pocillos; en el caso de las fermentaciones sólidas, empleamos placas multipocillo con 300 µl de medio y para las microfermentaciones líquidas, empleamos placas multipocillo *deep-well* con 1,2ml de capacidad utilizando el “sistema Duetz” (www.enzyscreen.com) (Duetz *et al.*, 2000; Minas *et al.*, 2000; Duetz, 2007).

Las condiciones de fermentación para cada una de las 32 cepas combinaron: 10 medios de fermentación distintos, incluyendo medios con diversa composición con distintas fuentes de carbono y de nitrógeno, utilizando desde medios muy limitados hasta medios complejos con gran cantidad de nutrientes; fermentaciones estáticas en medios sólidos y cultivos en agitación en medios líquidos; y tiempos de incubación de 7 y 14 días.

4.12.1.1. Detección de actividades antimicrobianas en los extractos de fermentación.

Puesto que en el experimento de las microfermentaciones cada cepa se sembró por duplicado en cada una de las condiciones de crecimiento, sólo hemos considerado activos aquellos extractos que han confirmado su actividad por duplicado y no hemos considerado aquellos que no eran activos en ambos casos.

De las 32 cepas de la familia *Pseudonocardiaceae* seleccionadas para el cultivo en microfermentaciones, 18 de ellas, pertenecientes al género *Amycolatopsis*, mostraron actividad en el experimento inicial realizado con tacos de agar (56,2%). Al ensayar estas 32 cepas a partir de microfermentaciones, aumentó hasta 20 (62,5%) el número de cepas activas, mientras que otras 12 cepas no presentaron ninguna actividad frente a las cepas diana utilizadas. Dieciséis de las 18 cepas inicialmente activas como tacos de agar, fueron capaces de reproducir su perfil de actividad al fermentarlos en el nuevo experimento mientras que en dos cepas de *Amycolatopsis pretoriensis* de Hawaii, 2001-35-0020A y 2001-35-0021A, se detectaron diversas actividades pero éstas no fueron del todo concluyentes dado que no se producían en los duplicados de cada fermentación, y por tanto no se han tenido en cuenta en el recuento de actividades. Sin embargo, otros 4 cultivos, que no fueron activos al ensayar los tacos de agar, sí lo fueron en alguna de las nuevas condiciones de fermentación probadas. Estos nuevos cultivos activos incluían 2 cepas del género *Amycolatopsis*, 1 del género *Pseudonocardia* y una cepa del género *Actinomycespora*. De las 12 cepas que no fueron activas en el estudio de las microfermentaciones, 2 son las ya mencionadas cepas de *Amycolatopsis pretoriensis* de Hawaii que sí fueron activas como tacos de agar, mientras que las 10 cepas restantes no fueron tampoco activas al ensayarse inicialmente como tacos de agar. Estas 10 cepas incluían 5 cepas del género *Pseudonocardia*, 2 cepas de *Actinomycespora*, 1 cepa del género *Amycolatopsis*, la cepa del género *Saccharothrix* y una cepa no asignada a ningún género pero perteneciente a la familia por su morfología (2001-34-0267A).

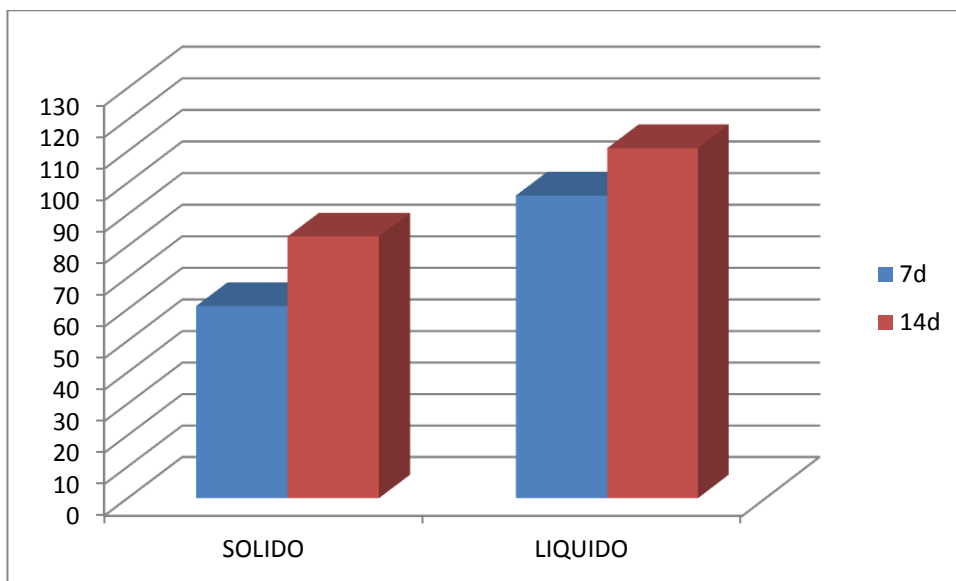
Cabe reseñar que 18 de las 21 cepas del género *Amycolatopsis* fueron activas (86%), salvo las dos cepas mencionadas de *Amycolatopsis pretoriensis* de Hawaii y la cepa de *Amycolatopsis thermalba* de Reunión que tampoco fue activa en el ensayo con tacos de agar. Además de las 18 del género *Amycolatopsis*, las otras dos cepas activas de las 20 detectadas fueron una de *Pseudonocardia alni* de Alaska y una de *Actinomycespora lutea* de Reunión. Como vemos, el 90% de las actividades se detectan entre las cepas de *Amycolatopsis*, si bien hay que tener en cuenta que 12 de ellas son cepas de *Amycolatopsis pretoriensis* aisladas de Hawaii y podrían ser en realidad diversos clones de la misma cepa dada su similitud en las diversas pruebas fenotípicas y genotípicas llevadas a cabo, aunque fueron seleccionadas porque presentaban distinta morfología. Es interesante señalar que, al contrario de lo que ocurre con las cepas de *Amycolatopsis* en donde el 86% de las mismas son activas, en el caso de las cepas de *Pseudonocardia*, sólo 1 de las 7 cepas fue activa (14%) o 1 de las 3 cepas de *Actinomycespora*.

A partir de las microfermentaciones se prepararon 2560 extractos, de los cuales, 351 fueron activos por duplicado (27,4%) (**Tablas 25 a, b, c y d**). En todas las condiciones

de crecimiento se encontraron fermentaciones activas, aunque el mayor número de actividades se obtuvo en los cultivos crecidos en medio líquido con 14 días de incubación (**Gráfica 1**).

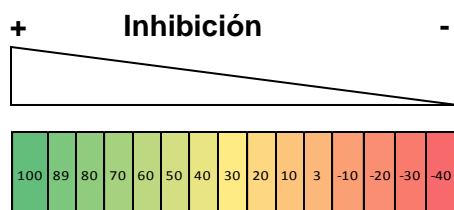
Con respecto a las condiciones de fermentación, en medios sólidos se obtuvieron 144 fermentaciones activas, 61 de ellas con 7 días de incubación y 83 a 14 días, mientras que en medios líquidos se obtuvo un total de 207 extractos activos, 96 a 7 días y 111 a 14 días. Como vemos, en cualquiera de los dos formatos de fermentación, se detectó mayor número de actividades a 14 días (194) que a 7 días (157). En la siguiente gráfica podemos ver resumidos estos resultados (**Gráfica 1**).

Gráfica 1: número de caldos activos obtenidos en función del tipo de fermentación y los tiempos de incubación.



En la **Tabla 25**, podemos ver un resumen comparando las actividades detectadas en las fermentaciones de 7 días, en medios sólidos y líquidos y 14 días, en medios sólidos y líquidos, dispuestas de izquierda a derecha y de arriba abajo. El detalle de actividades puede verse en las **Tablas 25a, b, c y d**.

En las **Tablas 25 a, b, c y d**, los porcentajes de inhibición están indicados por el siguiente código de colores, siendo el color verde el que indica los mayores porcentajes de inhibición.



221

Tabla 25a: Actividades detectadas para cada cultivo crecido en medio sólido a 7 días de incubación. Los números indican el porcentaje de inhibición para cada una de las cepas de ensayo (*Staphylococcus aureus* EPI167 / *Acinetobacter baumannii* MB5973 / *Pseudomonas aeruginosa* PAO5919 / *Candida albicans* MY1055).

CEPA	ORIGEN	MEDIO	DEF-15				DEF-15s				DEF15-Sc				DNPM				FPY-12			
			EPI167	CLS973	PAO_1_5919	MY1055	EPI167	CLS973	PAO_1_5919	MY1055	EPI167	CLS973	PAO_1_5919	MY1055	EPI167	CLS973	PAO_1_5919	MY1055	EPI167	CLS973	PAO_1_5919	MY1055
2001-34-0014A	ALASKA	Pseudonocardia alni DSM44104(T)	4	33	-20	-8	7	18	-10	-7	7	20	-11	-4	8	10	-8	-3	37	9	-17	-10
			6	39	-13	-9	6	26	-5	-7	12	31	-9	-4	13	26	-1	-3	24	12	-13	-9
2001-34-0015A	ALASKA	Pseudonocardia alni DSM44104(T)	9	39	-16	-8	5	33	-4	-6	9	43	-9	-5	25	31	-6	-4	45	17	-17	-11
			8	53	-30	-9	9	42	-4	-6	11	46	-2	-5	25	59	2	-1	43	41	-9	-9
2001-34-0017A	ALASKA	Pseudonocardia alni DSM44104(T)	9	37	-23	-8	7	33	-15	-6	10	37	-14	-6	12	39	-7	-4	45	37	-20	-11
			6	51	-28	-8	9	41	-15	-6	8	42	-11	-6	6	44	5	-3	27	21	-20	-12
2001-34-0242A	ALASKA	Pseudonocardia alni DSM44104(T)	-44	-3	-31	-8	-5	19	-7	-5	9	25	-11	-4	-35	1	-4	-2	40	18	-14	-11
			-17	22	-30	-8	8	24	-5	-5	-5	7	-21	-42	-31	-10	-5	-2	24	13	-15	-11
2001-35-0026A	HAWAII	Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	100	17	-22	-3	102	8	-3	-2	100	9	-11	0	99	41	6	-3	100	4	-16	-12
			93	19	-29	-3	102	25	0	-2	100	6	-15	-1	99	16	-1	-3	99	-15	-22	-9
2001-35-0020A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	-4	15	-20	-4	5	29	-4	1	-4	25	-15	-3	-4	63	5	-2	34	34	-16	-12
			-7	24	-21	-4	9	19	-4	7	-16	23	-16	-2	-8	30	-5	0	35	34	-18	-11
2001-35-0021A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	-4	21	-21	-5	11	42	-14	3	-1	29	-14	-3	-6	50	-9	-3	39	32	-16	-11
			-7	25	-16	-4	20	36	-12	6	-3	35	-13	-4	-11	21	-10	-3	36	29	-17	-11
2001-35-0023A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	-14	15	-8	-1	0	26	-5	1	-19	9	-8	1	-9	20	-5	-1	99	16	-31	-12
			100	6	-12	-3	2	32	-1	0	99	11	-8	0	-17	11	-7	-2	99	12	-30	-11
2001-35-0024A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	-21	-16	-38	2	-14	4	-10	-4	-7	14	-31	1	-37	41	5	-12	48	7	-22	-11
			-14	19	-33	-2	-10	1	-10	-3	-31	7	-27	1	-43	32	3	-1	45	4	-16	-9
2001-35-0025A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	-7	27	-25	-12	-13	1	-6	-6	-13	21	-19	-11	-6	44	14	-5	39	10	-11	-9
			5	20	-27	-13	-16	18	5	-1	-3	15	-21	-12	5	30	16	-5	40	20	-8	-9
2001-35-0029A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	11	16	-13	-2	-6	36	1	-1	99	11	-13	0	-3	12	2	-3	100	24	-27	-12
			0	14	-12	-3	0	30	5	-1	99	12	-10	0	-2	-1	8	-4	99	-5	-28	-10
2001-35-0032A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	-12	37	-22	-4	-9	29	-1	0	-11	19	-17	-2	-2	42	-6	-3	7	33	-32	-13
			-5	13	-22	-6	3	37	3	0	-9	18	-16	-4	-6	19	-2	-4	9	30	-30	-13
2001-35-0037A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	12	17	-19	-1	32	-22	-11	-6	100	23	-21	-1	-6	29	3	-3	99	24	-12	-13
			-14	19	-18	-2	32	-15	-10	-6	98	1	-12	-1	-19	-23	-1	-4	100	23	-10	-13
2001-35-0039A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	100	34	-19	-1	21	33	-8	-2	99	30	-15	0	-11	45	-3	-4	28	33	-28	-11
			99	32	-17	-3	1	30	-10	-3	99	31	-16	-1	-26	23	-7	-3	31	31	-30	-10
2001-35-0046A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	100	-6	-10	-1	6	-26	-1	-1	100	-20	-3	0	-4	8	-6	1	101	-23	-22	-7
			101	-14	-10	-1	14	-17	1	-3	100	-13	-6	-1	-9	-34	-5	-1	98	8	-20	-7
2001-35-0049A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	100	11	-22	-4	41	-2	9	-4	100	-3	-11	-4	-9	-11	-17	0	100	-18	-24	-9
			101	-3	-35	-5	3	-10	3	-4	98	-33	-13	-4	-8	-43	2	0	100	-25	-28	-8
2001-35-0052A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	98	16	-16	-3	33	-3	-2	-3	100	2	-13	-1	10	58	1	-2	99	19	-29	-12
			99	8	-16	-4	48	15	1	-4	100	15	-11	-1	-9	17	-4	-3	99	21	-27	-11
2001-35-0054A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	22	12	-26	-1	6	30	-3	-1	22	0	-19	1	-6	58	4	-2	99	9	-25	-12
			39	8	-23	-4	9	12	-6	-2	100	13	-17	0	-11	17	-7	-3	99	0	-22	-12
2001-35-0063A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	-19	23	-21	-2	-2	22	1	-1	-18	8	-10	-1	1	61	12	-2	99	27	-28	-12
			-16	17	-8	-5	1	9	-1	-3	-16	18	-12	-1	-2	13	2	-3	100	-17	-25	-12
2001-35-0119A	HAWAII	Pseudonocardia alaniniphila YIM 16303(T)	-10	43	-24	-4	9	20	-15	-6	-5	26	-22	-3	26	54	-3	-1	27	33	-22	-13
			-39	11	-14	-6	-6	-3	-8	-8	-4	3	-9	-4	-23	28	-4	-4	34	11	-18	-13
2001-35-0196A	HAWAII	Pseudonocardia acaciae GIMKU095(T)	-47	13	-22	-4	-7	-4	-9	-2	-4	-3	-17	-3	23	66	-3	-3	38	19	-16	-11
			-45	7	-13	-6	-11	18	-15	-8	-2	5	-9	-3	-4	1	-2	-4	37	8	-16	-11
2001-35-0140A	HAWAII	Saccharothrix asensis NRRL B-16107(T)	0	7	-22	-3	17	-3	-12	-6	-5	12	-15	-2	41	23	6	-2	33	29	-19	-11
			2	-1	-15	-6	21	-7	-9	-6	0	2	-8	-2	40	18	1	-4	36	15	-13	-13
2001-34-0245A	REUNION ISLAND	Actinomyces sp. chlora TT071-57(T)	-3	18	-10	-3	16	24	-12	-1	3	12	-7	-1	9	21	-8	-2	17	20	-11	-9
			-5	16	-9	-4	16	19	-3	2	2	11	-7	-1	12	11	-5	-1	11	5	-13	-11
2001-34-0342A	REUNION ISLAND	Actinomyces sp. lutea TT00-04(T)	2	36	-24	-5	10	35	-10	2	3	32	-17	-2	30	56	2	-2	46	31	-22	-12
			4	43	-24	-5	7	39	-9	1	3	32	-18	-3	25	44	-16	-1	30	26	-25	-12
2001-34-0353A	REUNION ISLAND	Actinomyces sp. lutea TT00-04(T)	-1	41	-16	-4	6	40	-3	-1	3	23	-12	-3	34	52	-11	-1	51	42	-12	-12
			-1	30	-18	-4	5	29	-1	-2	4	14	-14	-2	29	24	-4	-1	33	35	-19	-12
2001-34-0068A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	2	10	-17	-4	12	22	-3	-3	99	27	-19	0	-4	37	-10	-2	38	20	-21	-15
			41	28	-21	-2	6	27	-4	0	100	50	-19	2	-6	41	0	-2	31	23	-21	-13
2001-34-0082A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	100	20	-34	-1	47	12	-10	0	100	24	-31	10	-12	29	-18	-3	29	14	-23	-14
			100	25	-28	0	44	0	-10	-1	100	48	-25	8	-13	29	-12	0	33	28	-19	-11
2001-34-0203A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	-8	9	-7	-2	12	26	1	2	1	10	-7	-2	21	23	-6	-1	37	10	-13	-12
			-2	8	-11	-4	10	26	-12	0	0	13	-8	-2	-23	6	-7	-1	31	13	-12	-9
2001-34-0359A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	-3	35	-19	-6	6	35	-6	-1	-6	26	-14	-4	-13	66	4	-3	44	36	-18	-13
			-6	20	-20	-6	5	4	-4	2	-5	21	-14	-2	-18	27	-18	-2	31	21	-19	-13
2001-34-0079A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis levingtonensis NRRL B-24131(T)	-3	15	-20	-4	6	25	-10	-1	0	11	-14	-3	-11	28	-12	-3	39	16	-23	-13
			-9	11	-24	-3	13	33	-5	2	-14	13	-17	-1	-16	28	-7	-2	32	24	-19	-12
2001-34-0266A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis thermalba SF45(T)	2	19	-22	-3	20	30	-7	-2	6	22	-15	-1	-11	45	-1	-1	45	33	-16	-9
			5	29	-19	-5	22	19	-3	0	3	10	-13	-1	-9	42	2	-2	36	37	-14	-9
2001-34-0267A	REUNION ISLAND		2	17	-15	-4	5	19	-3	-1	10	9	-12	-1	8	16	-13	-1	29	10	-18	-12
			5	4	-17	-5	7	15	-1	-2	10	4	-10	-1	11	16	-3	-1	23	12	-16	-12

CEPA	ORIGEN	MEDIO	ESPECIE MÁS CERCANA (EzTaxon)	FR-23				FRM				GOT				KHC				YME			
				EPI167	CLS973	PAO_1_5919	MY1055	EPI167	CLS973	PAO_1_5919	MY1055	EPI167	CLS973	PAO_1_5919	MY1055	EPI167	CLS973	PAO_1_5919	MY1055	EPI167	CLS973	PAO_1_5919	MY1055
2001-34-0014A	ALASKA	Pseudonocardia alni DSM 44104(T)		-3 4	15 26	-38 -10	-2 -1	0 5	9 12	-15 0	-2 -1	-30 -33	21 33	-11 -8	-2 6	14 21	12 3	-6 -4	2 4	-6 -9	29 34	4 10	-4 -3
2001-34-0015A	ALASKA	Pseudonocardia alni DSM 44104(T)		11 11	22 33	-18 -19	-1 -1	0 7	18 2	-8 5	-2 -2	-31 -38	41 59	-13 -10	-2 -1	34 19	22 55	-9 1	6 5	-10 -13	36 59	3 15	-4 -3
2001-34-0017A	ALASKA	Pseudonocardia alni DSM 44104(T)		1 6	27 42	-34 -22	-4 -3	-1 5	34 14	-5 0	-2 0	-43 -47	60 51	-19 -17	-1 9	30 34	23 27	-10 -9	5 10	-15 -15	40 50	-5 -6	-5 -3
2001-34-0242A	ALASKA	Pseudonocardia alni DSM 44104(T)		-1 5	25 27	-6 -10	-4 -1	-14 -13	16 21	-8 -5	-1 0	-44 -32	22 37	-20 -9	-5 1	14 -4	17 19	1 -4	2 2	-3 -7	30 16	9 8	-4 -3
2001-35-0026A	HAWAII	Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)		100 102	42 38	-14 -14	-3 0	100 99	9 6	-26 -13	2 3	99 100	24 20	-42 -38	-7 -6	98 100	20 -6	-28 -12	7 11	100 100	37 0	-9 -2	-3 -7
2001-35-0020A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)		7 5	41 37	-19 -23	-5 -1	-72 -73	26 -1	-22 -22	3 4	-37 -37	54 56	-22 -21	49 57	14 14	27 22	-15 -12	7 9	-10 -11	24 -10	-9 -11	-5 -5
2001-35-0021A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)		1 -21	46 61	-15 7	-5 -5	-72 -69	-30 35	-27 -21	4 4	-42 -40	56 62	-23 -19	34 39	2 5	31 49	-17 -9	4 5	-11 -8	27 11	-8 -6	-5 -5
2001-35-0023A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)		-3 23	24 14	13 -2	-3 -2	-74 -78	3 15	-28 -29	3 2	-29 -58	22 26	-36 -33	-3 -4	-25 -26	11 5	-7 -8	2 3	101 100	-36 -35	1 5	-1 -2
2001-35-0024A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)		-47 -53	-6 1	-35 -21	-1 -2	-30 -35	45 34	5 3	-4 -2	-64 -66	-26 -9	-51 -50	-6 -4	-34 -20	17 -29	-11 -9	7 7	-20 0	20 -18	2 0	-18 2
2001-35-0025A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)		-13 -35	34 28	-9 -25	-6 -6	-77 -50	1 1	22 22	-2 -1	-29 -45	46 34	-30 -32	-6 -6	-40 -25	22 36	1 -3	-3 -3	-16 -12	41 28	4 9	-4 -5
2001-35-0029A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)		20 0	39 26	-11 1	-2 -2	-61 -59	29 32	-21 -14	2 1	-66 -66	39 44	-31 -38	-5 -6	-24 -26	6 -11	-7 -3	5 5	100 101	-42 -12	-7 -2	-2 -3
2001-35-0032A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)		-45 -31	47 35	-17 -13	-2 -3	-72 -66	19 32	-27 -23	2 2	-58 -53	44 45	-40 -37	-1 -3	-27 -24	-16 1	-18 -12	1 1	45 2	-2 4	-13 -2	-3 -4
2001-35-0037A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)		67 98	42 22	-4 -22	-4 -3	-28 -43	-10 -47	-16 -38	0 -2	-92 98	35 32	-34 -35	-6 -5	100 101	1 6	-17 -10	4 3	100 100	45 1	1 5	-2 -2
2001-35-0039A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)		99 99	34 36	-18 -9	-4 -2	-57 6	43 1	-21 -37	1 2	95 99	43 44	-38 -36	-5 -4	-35 -20	17 20	-14 -13	2 2	14 100	34 31	-7 -6	-4 -3
2001-35-0046A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)		94 41	32 22	18 12	-3 -3	100 99	-3 -9	-18 -19	2 2	93 76	9 -30	-38 -33	-4 -4	58 11	6 -14	-3 -7	6 7	99 102	-31 -13	-1 0	0 0
2001-35-0049A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)		49 54	27 20	-1 3	-3 -2	99 100	5 -22	-18 -28	1 0	91 98	-19 -8	-40 -43	-6 -6	100 50	-21 -14	-10 -10	3 4	100 100	-22 -17	5 7	-2 -2
2001-35-0052A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)		99 96	39 27	3 -8	-2 -2	-71 -67	21 10	-32 -37	1 0	-55 97	37 38	-36 -38	-4 -4	99 99	-44 1	-6 -10	1 4	87 100	7 -25	4 8	-6 -7
2001-35-0054A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)		-4 14	30 28	-32 -30	-5 -3	-69 -64	-54 -26	-41 -40	0 1	100 100	-2 0	-34 -32	-7 -6	-32 -26	-36 -19	-13 -10	-1 2	100 100	9 -17	-15 0	-4 -5
2001-35-0063A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)		-11 -23	44 34	-12 2	-3 -2	-59 -61	1 26	-30 -15	1 2	-70 -64	17 23	-39 -36	-5 -6	34 -26	10 3	-11 -4	5 5	100 100	-14 -17	-13 5	-2 -3
2001-35-0119A	HAWAII	Pseudonocardia alaniniphila YIM 16303(T)		8 -13	48 40	-33 -23	-3 -1	-69 -28	40 -53	-19 -16	-1 -1	-54 -56	46 37	-25 -31	11 -1	33 -6	52 19	-5 -13	5 4	-5 -7	37 21	-27 -4	-6 -7
2001-35-0196A	HAWAII	Pseudonocardia acaciae GMKU095(T)		-2 -11	55 13	-3 -20	-4 -4	-13 -4	16 -43	-15 -26	0 0	-48 -48	56 49	-20 -19	-4 -2	13 -3	37 -24	-14 -18	2 1	2 -3	33 12	-2 -2	-3 -6
2001-35-0140A	HAWAII	Saccharothrix texasensis NRRL B-16107(T)		-29 -11	16 -9	-32 -32	-3 -1	-9 4	0 -48	-12 -21	1 1	-56 -47	11 -2	-40 -33	-6 -7	49 48	15 -10	-10 -11	1 1	37 41	29 6	-12 2	-4 -4
2001-34-0245A	REUNION ISLAND	Actinomycespora chiora TT071-57(T)		-21 -11	22 21	-22 -6	-3 -1	-68 -57	10 -10	-26 -27	1 2	-44 -38	37 30	-10 -7	0 2	18 17	11 5	-8 -3	5 8	-16 6	16 12	-4 -2	-5 -4
2001-34-0342A	REUNION ISLAND	Actinomycespora lutea TT00-04(T)		12 10	45 21	-23 -19	-3 -3	-67 -58	30 39	-21 -18	0 1	-41 -47	47 43	-21 -18	4 3	29 27	39 29	-19 -15	4 7	1 -3	34 25	-18 -16	-4 -5
2001-34-0353A	REUNION ISLAND	Actinomycespora lutea TT00-04(T)		-5 -5	46 32	-28 -16	-3 -2	-68 -53	22 28	-23 -17	1 1	-46 -40	58 11	-17 -15	2 10	31 33	-2 31	-19 -22	6 7	-3 -3	38 36	-10 -19	-3 -5
2001-34-0068A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)		5 -16	41 52	-23 -26	-4 -4	-78 -69	-5 46	-29 -21	1 2	-39 -49	46 44	-25 -27	-4 -3	22 23	32 33	-16 -15	4 5	-3 -3	22 28	-6 -21	-5 -5
2001-34-0082A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)		-12 3	33 47	-15 -9	-6 -5	-74 -53	-44 47	-36 -23	2 1	100 101	36 49	-27 -24	-5 -4	7 17	15 8	-17 -7	3 3	100 101	22 26	-11 -5	-3 -2
2001-34-0203A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)		-8 -14	32 25	-24 -11	-5 -4	-88 -82	-18 -27	-27 -28	4 4	-48 -45	38 26	-17 -14	8 17	4 -5	11 12	-1 -7	4 4	-7 -6	6 0	-8 -8	-3 -4
2001-34-0359A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)		-5 -19	49 55	-21 -16	-6 -5	-72 -68	22 50	-18 -16	2 2	-46 -43	55 43	-26 -22	35 45	12 25	21 -11	-15 -11	5 5	-4 -15	36 -11	6 -18	-5 -6
2001-34-0079A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis leixingtonensis NRRL B-24131(T)		-2 -17	35 47	-23 -14	-4 -6	-90 -68	-79 16	-35 -18	3 3	-43 -48	47 45	-28 -25	28 52	14 17	19 35	-16 -10	3 4	-6 -11	6 21	-8 -18	-5 -5
2001-34-0266A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis thermalba SF45(T)		-5 -3	48 43	-7 -5	0 -1	-79 -65	-15 18	-31 -19	3 5	-36 -36	61 50	-19 -14	1 -2	17 10	29 28	-11 -12	4 6	14 -1	20 35	-4 4	-3 -4
2001-34-0267A	REUNION ISLAND			10 -1	25 24	-27 -13	-3 -2	-68 -75	7 -10	-27 -21	2 2	-30 -39	26 27	-13 -12	7 10	14 14	-3 6	-9 -10	4 4	8 6	14 12	-1 -2	-5 -5

Tabla 25b: actividades detectadas para cada cultivo crecido en medio sólido a 14 días de incubación. Los números indican el porcentaje de inhibición para cada una de las cepas de ensayo (*Staphylococcus aureus* EPI167 / *Acinetobacter baumannii* MB5973 / *Pseudomonas aeruginosa* PAO5919 / *Candida albicans* MY1055).

CEPA	ORIGEN	MEDIO	DEF-15				DEF-15S				DEF15-Sc				DNPM				FPY-12			
			EPI167	CLS973	PAO 1 5919	MY1055	EPI167	CLS973	PAO 1 5919	MY1055	EPI167	CLS973	PAO 1 5919	MY1055	EPI167	CLS973	PAO 1 5919	MY1055	EPI167	CLS973	PAO 1 5919	MY1055
2001-34-0014A	ALASKA	Pseudonocardia alni DSM 44104(T)	12	27	14	-6	23	19	10	-7	27	26	-2	-8	14	-11	19	-2	44	14	-15	-7
			19	30	14	-5	30	28	17	-7	28	35	9	-7	31	21	25	-1	38	19	2	-4
2001-34-0015A	ALASKA	Pseudonocardia alni DSM 44104(T)	18	42	6	-4	31	33	2	-8	27	43	-9	-7	30	17	12	-1	49	27	-2	-6
			23	52	-14	-5	33	50	1	-9	23	55	-5	-5	34	62	41	9	47	32	1	-4
2001-34-0017A	ALASKA	Pseudonocardia alni DSM 44104(T)	22	32	-1	-5	30	40	-15	-6	27	39	-16	-7	17	30	2	-3	52	32	-8	-8
			24	43	0	-3	30	46	-7	-5	26	49	-8	-7	17	80	32	14	44	39	-28	-9
2001-34-0242A	ALASKA	Pseudonocardia alni DSM 44104(T)	-12	13	7	-2	10	20	4	-8	9	21	3	-4	-10	2	17	-1	40	21	4	-6
			12	13	8	-2	16	25	5	-4	3	22	1	-1	3	22	28	2	33	22	5	-5
2001-35-0026A	HAWAII	Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	99	-14	-5	-1	100	10	3	-5	99	16	-10	-4	100	45	-13	5	100	36	-8	-6
			100	-15	-3	0	51	25	5	-3	99	14	-15	-4	99	-45	20	1	100	43	-5	-3
2001-35-0020A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	8	16	-3	-1	6	38	-4	-2	26	34	-10	-3	-1	81	16	8	30	20	-13	-10
			1	20	-3	0	10	19	-2	-2	24	37	-13	-4	-2	58	14	4	26	33	-12	-11
2001-35-0021A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	13	4	-7	-2	10	50	-2	-2	26	22	-19	-4	-4	77	-18	2	38	20	-21	-12
			8	22	-4	-1	15	40	-3	-3	21	35	-19	-6	-4	65	12	1	35	24	-16	-9
2001-35-0023A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	100	7	7	1	100	13	-3	0	101	18	-12	1	-13	-9	6	2	100	7	-23	-3
			99	8	3	-1	101	-13	13	0	101	-24	-7	-1	-10	15	0	0	100	-1	-16	-3
2001-35-0024A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	-1	6	3	-4	15	6	3	-7	10	13	-15	-4	-29	20	17	0	32	3	4	-10
			-10	-1	-11	0	7	-26	-1	-5	1	12	-17	-2	-32	38	15	3	93	9	15	-9
2001-35-0025A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	17	1	-17	-5	14	34	-2	-5	28	18	-25	-7	-15	41	28	1	45	26	-5	-5
			27	-3	-12	-5	19	34	4	-4	36	21	-23	-9	-18	26	19	-1	41	19	-4	-7
2001-35-0029A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	100	13	-3	-2	100	-12	6	-3	100	-13	-11	-3	2	23	26	6	100	10	-19	-3
			100	-23	1	0	101	0	8	-2	100	-25	-11	-4	1	5	21	1	100	-5	-7	-4
2001-35-0032A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	100	12	-8	0	-1	43	1	-3	100	24	-17	-2	-2	64	25	2	99	12	-13	-5
			-3	-32	-5	1	100	26	5	-2	16	32	-10	-2	-7	29	4	0	98	-7	-18	-7
2001-35-0037A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	48	-44	-6	-1	10	42	-5	-3	65	7	-16	-3	35	33	24	14	100	22	-12	-3
			29	-3	-5	-2	60	17	-3	-4	34	-44	-17	-3	21	-3	23	15	44	8	-10	-1
2001-35-0039A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	99	24	-6	-1	99	20	-14	-5	100	28	-22	-3	28	68	22	13	54	10	-24	-8
			98	1	-12	-2	100	4	-10	-1	100	25	-25	-3	7	35	-24	0	99	40	-21	-6
2001-35-0046A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	100	3	9	1	59	-46	22	1	100	-18	-13	-1	12	-26	12	2	100	-9	-14	-3
			70	-2	6	-1	63	-44	19	0	100	-38	-5	-1	13	-26	12	2	100	-7	-11	-2
2001-35-0049A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	100	-1	-10	-4	101	-55	18	-5	100	-4	7	-6	15	-31	35	0	101	-14	16	-2
			100	-5	18	-2	101	-59	10	-4	100	-17	0	-4	10	-35	26	-1	101	-16	14	-3
2001-35-0052A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	99	-2	4	-2	49	-12	-1	-5	100	12	-14	-9	0	46	34	2	100	0	-13	-4
			99	-25	-1	-5	66	13	10	-3	100	16	-8	-9	65	18	20	-5	99	2	-7	-1
2001-35-0054A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	11	-28	-19	0	16	-38	4	-2	36	0	-14	-3	5	-26	17	0	100	-23	-15	-3
			-3	-35	-3	1	42	-34	-4	-2	33	-4	-16	-3	7	-15	13	1	100	-17	-16	-2
2001-35-0063A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	54	-25	-3	-2	66	-24	10	-4	41	13	-9	-4	9	81	32	13	100	0	-10	-5
			31	-17	2	0	100	-34	4	-2	46	-2	-15	-3	6	-26	17	2	100	-15	-11	-4
2001-35-0119A	HAWAII	Pseudonocardia alaniniphila YIM 16303(T)	5	23	-10	-2	14	37	-12	-5	33	41	-11	-3	27	71	-13	1	33	34	-10	-10
			7	1	-7	-1	21	27	-14	-5	19	31	-16	-6	27	39	11	2	33	6	-12	-11
2001-35-0196A	HAWAII	Pseudonocardia acaciae GMKU095(T)	5	14	-15	0	29	23	-22	-1	14	22	-19	-5	40	67	27	16	47	8	-10	-8
			6	16	-11	-1	29	16	-12	1	32	20	-22	-2	35	28	6	4	41	0	-16	-9
2001-35-0140A	HAWAII	Saccharothrix exansensis NRRL B-16107(T)	3	-17	-14	0	32	9	-10	3	17	-19	-15	-2	33	43	24	13	39	-1	-12	-9
			4	2	-2	0	33	8	-12	-7	18	18	-19	-3	26	13	4	2	49	22	-5	-6
2001-34-0245A	REUNION ISLAND	Actinomyces sp. chlora TT071-57(T)	10	1	-4	0	27	13	5	0	32	20	-8	-2	30	18	-2	1	16	17	-17	-10
			20	8	11	0	18	12	-8	-1	30	13	1	-2	30	25	10	3	36	9	-17	-11
2001-34-0342A	REUNION ISLAND	Actinomyces sp. lutea TT00-04(T)	16	-12	-2	-3	16	41	-3	-3	21	22	-9	-5	30	77	27	1	39	33	-8	-10
			13	12	-2	-1	16	37	-7	0	21	37	-11	-4	64	24	5	-3	38	29	-9	-12
2001-34-0353A	REUNION ISLAND	Actinomyces sp. lutea TT00-04(T)	14	28	3	0	14	34	2	-1	25	39	-6	-3	36	73	28	6	46	35	-6	-9
			13	15	0	-2	18	41	0	3	22	42	-6	-4	35	66	20	2	35	34	-8	-11
2001-34-0068A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	100	47	-6	6	100	40	2	-1	100	36	-14	7	-2	11	2	-1	48	19	-14	-11
			100	7	-9	7	101	41	1	-1	99	40	-36	7	-2	68	28	3	35	32	-9	-12
2001-34-0082A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	100	23	-12	12	100	23	-8	16	99	29	-31	39	-12	24	-18	0	33	5	-23	-11
			100	40	-15	12	101	42	-4	13	100	50	-22	44	-13	21	-7	1	37	27	-19	-11
2001-34-0203A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	17	20	7	-1	19	14	4	0	31	12	-9	-2	-11	3	4	2	37	12	-24	-10
			16	12	2	-2	20	21	8	-2	26	6	-18	-3	-16	-5	-8	1	34	10	-23	-11
2001-34-0359A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	9	-7	-8	-1	8	44	1	-3	19	32	-9	-4	-7	77	24	3	38	40	-10	-9
			2	-14	0	0	12	48	-1	-3	21	30	-10	-4	-8	80	25	3	26	24	-8	-11
2001-34-0079A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis leingtonensis NRRL B-24131(T)	0	-4	-1	0	9	33	2	-2	22	24	-15	-3	-10	-24	4	0	42	14	-15	-10
			3	19	-5	-3	10	37	4	-3	18	31	-13	-4	-7	80	25	7	36	22	-13	-11
2001-34-0266A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis thermalba SF45(T)	18	-31	-1	-1	15	11	15	-3	35	13	-32	-10	39	34	25	-2	42	27	-5	-7
			21	-1	-15	-8	25	35	20	-3	26	28	-8	-4	14	48	30	-1	38	27	-2	-9
2001-34-0267A	REUNION ISLAND		25	15	3	-2	17	17	13	-4	37	15	6	-2	25	-5	-7	0	21	16	1	-10
			26	-1	17	-3	16	16	9	-4	37	12	10	-5	30	9	20	0	25	9	1	-11

CEPA	ORIGEN	MEDIO	FR-23				FRM				GOT				KHC				YME			
			EPI167	CL5973	PAO_1_5919	MY1055	EPI167	CL5973	PAO_1_5919	MY1055	EPI167	CL5973	PAO_1_5919	MY1055	EPI167	CL5973	PAO_1_5919	MY1055	EPI167	CL5973	PAO_1_5919	MY1055
2001-34-0014A	ALASKA	Pseudonocardia alni DSM 44104(T)	19	16	-1	-4	28	31	-1	-5	4	29	-2	-7	30	17	4	0	-6	28	2	-5
			22	28	16	-6	32	38	9	-3	2	39	3	-3	34	32	25	2	-6	35	12	-5
2001-34-0015A	ALASKA	Pseudonocardia alni DSM 44104(T)	25	23	-9	-4	29	40	-5	-5	-2	50	-2	-2	41	31	14	2	-10	36	2	-5
			9	64	20	-6	27	60	20	1	-6	78	6	-2	29	59	31	1	-9	32	12	-4
2001-34-0017A	ALASKA	Pseudonocardia alni DSM 44104(T)	14	39	-12	-4	30	42	-12	-3	12	65	-5	6	41	30	-10	6	-12	38	-2	-5
			17	52	2	-8	33	47	-6	-4	-7	73	-8	6	23	50	12	7	-11	43	9	-5
2001-34-0242A	ALASKA	Pseudonocardia alni DSM 44104(T)	-28	1	-8	-3	32	34	0	-5	-4	2	-6	3	32	23	14	0	-14	33	6	-4
			13	31	19	-8	35	36	8	-4	3	23	-3	1	4	38	31	1	14	20	16	-4
2001-35-0026A	HAWAII	Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	99	57	11	-4	100	46	-13	-3	99	68	-10	3	100	13	1	3	99	12	1	-4
			99	46	6	1	100	43	-10	-3	-9	84	5	8	92	25	8	5	99	13	-2	-4
2001-35-0020A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	30	50	-5	-7	-22	24	-19	1	8	71	-8	10	9	38	-6	1	-2	35	-8	-2
			15	50	9	-4	-23	28	-12	0	-21	74	-8	11	16	38	-3	2	-1	34	-5	-4
2001-35-0021A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	18	66	-8	-7	-20	23	-25	1	-16	82	-16	3	2	47	-12	2	0	21	-13	-3
			29	52	-17	-6	-18	59	-22	-1	-19	85	-13	5	-2	55	11	1	4	30	-14	-3
2001-35-0023A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	7	22	-6	-4	-18	13	-30	1	24	20	-21	0	13	-1	-10	8	100	-32	-3	1
			9	28	-6	-4	-11	18	-27	-1	48	30	-17	-2	14	38	-9	6	101	-32	-6	0
2001-35-0024A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	-14	-32	-5	-4	-8	50	10	-14	-32	-14	-32	2	-2	20	12	0	-2	22	10	-2
			-8	-59	6	-5	0	45	12	-3	-21	-6	-22	0	4	24	21	2	3	-29	24	-4
2001-35-0025A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	-10	40	7	-7	-13	45	19	-2	-27	63	-3	-2	-3	48	30	-2	-5	22	3	-6
			-11	34	-5	-9	-16	43	18	-2	-39	58	-7	-4	3	43	17	-3	2	26	3	-4
2001-35-0029A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	15	9	24	6	99	-32	-5	1	4	60	-13	5	25	-22	6	6	99	-21	5	-1
			18	52	31	7	100	22	-5	1	20	68	-13	2	19	20	11	6	100	0	7	-1
2001-35-0032A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	37	88	27	14	-25	34	-20	0	24	63	-14	5	12	2	1	5	100	-16	1	-2
			26	85	18	4	-27	34	-23	-2	64	76	-15	4	17	57	14	6	99	-20	1	-2
2001-35-0037A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	35	2	-9	-5	70	25	1	-1	100	27	-34	-1	99	-13	-7	3	100	15	-2	-1
			55	-29	-9	-4	65	10	-5	-1	100	22	-34	-1	100	-11	-5	4	100	12	3	-2
2001-35-0039A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	99	84	-8	1	47	63	-15	0	100	49	-39	-2	6	1	-14	3	100	13	-3	-2
			100	83	0	5	100	27	-19	-1	4	90	-12	10	13	37	-14	8	100	12	-12	-1
2001-35-0046A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	10	-7	-7	-3	99	-11	-11	1	43	24	-21	0	100	0	-12	6	100	-35	-9	1
			7	12	-8	-4	100	-44	-10	1	20	26	-18	-2	21	18	-13	6	99	-22	-5	-1
2001-35-0049A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	9	-16	3	-7	100	-35	5	-1	78	38	-10	-4	14	33	19	3	99	-23	10	-3
			10	-3	11	-6	99	-41	5	0	72	29	-7	-4	12	-28	5	3	100	-30	23	-2
2001-35-0052A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	22	55	22	-2	86	34	-6	-5	-1	85	6	8	100	-5	12	0	49	24	13	-5
			8	-5	22	-4	100	38	9	-4	99	75	-3	2	100	5	12	5	100	1	8	-4
2001-35-0054A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	14	40	11	0	-3	-16	-17	-1	92	45	-14	7	8	-15	8	6	100	-19	3	-1
			14	32	26	2	-9	-48	-16	0	100	41	-12	10	8	-6	9	7	100	-18	7	0
2001-35-0063A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	19	77	32	15	99	44	3	0	-10	73	-9	6	64	9	3	5	100	8	6	-2
			8	52	26	1	99	-36	-5	0	45	79	-7	6	21	25	5	6	101	-17	7	0
2001-35-0119A	HAWAII	Pseudonocardia alaniniphila YIM 16303(T)	29	49	-3	-5	-20	59	-12	-3	-12	64	-9	-1	37	53	1	4	8	37	0	-5
			-53	-27	-16	-3	11	23	-13	-2	4	81	3	18	24	15	-2	2	6	39	0	-3
2001-35-0196A	HAWAII	Pseudonocardia acaciae GMKU095(T)	-66	43	-19	-2	20	66	-16	-1	-32	56	-24	-2	24	-6	-12	1	4	32	-11	-4
			-14	10	-24	-2	12	26	-20	-2	-32	60	-24	-2	28	-1	-9	2	12	15	-8	-3
2001-35-0140A	HAWAII	Saccharothrix texasensis NRRL B-16107(T)	-20	13	-15	-4	33	-9	-18	-3	6	29	-24	-2	32	9	-2	1	40	14	1	-2
			-29	-28	-22	-5	44	-1	-16	-1	-23	18	-23	-2	12	-4	2	2	45	13	4	-2
2001-34-0245A	REUNION ISLAND	Actinomycespora chlorea TT071-57(T)	-58	24	-18	-4	24	32	-21	1	-19	48	-18	0	-4	27	-15	2	3	29	-7	-2
			17	16	-16	-5	23	14	-21	1	-10	36	-11	1	22	21	-14	-1	13	20	0	-1
2001-34-0342A	REUNION ISLAND	Actinomycespora lutea TT00-04(T)	44	32	-15	-8	-14	38	-22	-2	-4	83	2	11	45	43	4	3	3	34	6	-5
			37	46	-9	-7	-9	26	-19	-2	-2	74	4	11	28	43	7	7	5	41	2	-3
2001-34-0353A	REUNION ISLAND	Actinomycespora lutea TT00-04(T)	41	66	16	3	-13	49	-11	1	3	75	3	7	34	43	9	4	7	39	1	-4
			36	56	-4	-6	-16	42	-17	0	-7	69	3	3	37	40	12	10	7	37	6	-5
2001-34-0068A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	35	45	-12	-6	-9	1	-20	0	100	96	1	38	12	35	2	0	100	38	6	1
			-6	68	22	1	-22	-4	-13	-1	99	91	-5	14	-19	34	8	5	100	75	1	2
2001-34-0082A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	23	66	19	2	99	100	-32	63	99	95	2	48	99	-9	-7	6	99	72	14	21
			40	75	34	13	100	79	-4	6	100	100	5	52	98	-8	-6	5	100	78	13	19
2001-34-0203A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	-3	9	-20	-6	-21	-9	-22	1	-23	29	-13	1	-1	11	-17	2	60	22	-7	1
			7	19	-21	-6	-18	12	-28	0	-21	34	-15	-1	3	29	-5	2	7	8	-14	-4
2001-34-0359A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	6	78	22	7	-23	28	-16	1	2	83	0	14	17	43	1	1	-3	36	-4	-5
			10	58	1	-8	-21	-11	-20	0	-17	82	-3	6	4	44	7	4	-2	40	1	-4
2001-34-0079A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis lextingtonensis NRRL B-24131(T)	20	41	-10	-8	-20	-35	-24	1	-23	65	-14	0	6	29	-5	1	1	31	-10	-4
			17	58	12	-2	-20	-11	-16	0	-25	71	-8	7	-4	27	-4	3	7	13	-4	-4
2001-34-0266A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis thermalba SF45(T)	-5	15	7	-5	-28	39	-3	-3	-3	88	10	9	10	23	11	-2	6	27	11	-3
			-4	71	22	-3	-1	45	7	-2	-9	81	9	2	13	31	13	-1	22	30	15	-5
2001-34-0267A	REUNION ISLAND		41	10	-7	-8	-14	26	-6	-1	-7	40	4	-3	26	20	16	3	2	32	11	-5
			41	15	-2	-7	-13	13	-10	-1	-7	35	3	-4	28	18	12	3	16	21	9	-5

Tabla 25c: actividades detectadas para cada cultivo crecido en medio líquido a 7 días de incubación. Los números indican el porcentaje de inhibición para cada una de las cepas de ensayo (*Staphylococcus aureus* EPI167 / *Acinetobacter baumannii* MB5973 / *Pseudomonas aeruginosa* PAO5919 / *Candida albicans* MY1055).

CEPA	ORIGEN	MEDIO	ESPECIE MÁS CERCANA (ExTaxon)	DEF-15				DEF-15S				DEF15-Sc				DNPM				FPY-12			
				EPI167	CLS973	PAO_1_5919	MY1055	EPI167	CLS973	PAO_1_5919	MY1055	EPI167	CLS973	PAO_1_5919	MY1055	EPI167	CLS973	PAO_1_5919	MY1055	EPI167	CLS973	PAO_1_5919	MY1055
2001-34-0014A	ALASKA		Pseudonocardia alni DSM 44104(T)	14	5	-9	-2	-3	-18	-7	-3	7	-6	-9	-4	13	13	-8	-2	23	12	-17	-10
				14	15	-8	-3	-5	-15	-5	-2	5	-2	-8	-4	11	16	-9	-2	28	23	-13	-9
2001-34-0015A	ALASKA		Pseudonocardia alni DSM 44104(T)	14	15	-10	-2	0	-17	-3	-3	2	1	-11	-3	1	22	-9	-3	25	26	-8	-11
				12	24	-7	-2	-14	-18	-4	-4	1	7	-7	-4	3	31	-5	-3	31	33	-12	-11
2001-34-0017A	ALASKA		Pseudonocardia alni DSM 44104(T)	12	16	-13	-4	1	-13	-11	-4	11	5	-12	-5	-13	28	-12	-2	22	36	-1	-10
				12	28	-11	-5	-2	-14	-11	0	5	12	-14	-4	-5	34	-9	-3	30	31	-11	-9
2001-34-0242A	ALASKA		Pseudonocardia alni DSM 44104(T)	11	8	-10	-3	0	-26	-6	-3	0	-18	-10	-4	14	15	-7	-2	30	1	-14	-7
				-16	-31	-14	-2	-8	-22	-9	-1	7	-4	-4	-4	-13	12	-7	-1	31	2	-11	-6
2001-35-0026A	HAWAII		Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	99	-5	-11	-1	100	-27	-11	4	97	-13	-14	1	100	-37	-12	-3	100	-30	-27	-11
				100	-2	-14	1	99	-21	-11	1	99	-24	-14	0	100	-39	-8	-2	99	-37	-29	-9
2001-35-0020A	HAWAII		Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	-17	-6	-10	-1	-34	-24	-8	6	-22	-2	-11	-1	-39	-23	-10	-1	16	-2	-20	-11
				-1	-5	-12	-2	99	-18	-11	5	99	0	-14	1	-40	-18	-10	-1	100	-35	-16	-10
2001-35-0021A	HAWAII		Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	0	-4	-12	-4	-27	-7	-9	5	-21	7	-11	-2	-37	-36	-13	-1	19	-3	-18	-11
				-6	16	-14	-4	-22	6	-10	0	-18	26	-12	-2	-35	-31	-16	-1	21	-27	-19	-12
2001-35-0023A	HAWAII		Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	99	-11	-4	5	100	-28	-5	2	100	-17	-6	4	-9	-46	-6	5	99	-46	-28	-7
				101	10	-8	4	100	-5	-9	2	100	-11	-7	3	-4	-47	-12	3	100	-42	-27	-7
2001-35-0024A	HAWAII		Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	-4	-9	-18	0	-5	-51	-9	2	-3	-65	-11	2	-30	-54	-10	4	12	-2	-27	-5
				-15	-14	-10	0	-11	-57	-10	2	99	-35	-10	4	101	-34	-10	4	45	-14	-22	-4
2001-35-0025A	HAWAII		Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	99	-14	-35	-7	100	-20	-7	-1	99	4	-10	4	-31	6	-8	3	100	13	-20	-8
				97	-18	-36	-4	99	-25	-7	0	99	-40	-11	2	55	4	-8	4	100	23	-20	-7
2001-35-0029A	HAWAII		Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	100	9	-8	-2	100	-23	-7	0	99	-31	-11	0	-44	-17	-4	1	99	-14	-25	-7
				99	-15	-10	1	99	-32	-5	-1	100	-8	-7	0	-44	-19	6	-2	100	-26	-26	-8
2001-35-0032A	HAWAII		Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	50	-12	-13	0	102	-31	-11	0	37	-4	-17	-1	24	-20	-12	-4	99	-31	-29	-13
				9	11	-16	0	100	-35	-10	-2	10	-10	-17	-1	-3	17	-8	0	100	-23	-27	-10
2001-35-0037A	HAWAII		Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	99	-28	-16	1	100	-35	-13	1	99	-58	-22	1	98	-19	-4	1	100	-23	-29	-9
				100	-22	-14	2	100	-40	-12	0	99	-33	-18	0	98	-23	-5	1	101	-28	-29	-10
2001-35-0039A	HAWAII		Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	100	-1	-13	1	100	-26	-12	3	99	-14	-17	1	45	-14	-8	2	99	-17	-27	-5
				99	-6	-12	1	100	-53	-16	2	99	11	-13	1	-44	-35	-8	2	99	-24	-28	-8
2001-35-0046A	HAWAII		Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	101	-32	-3	3	99	-33	-7	1	100	-3	-6	2	-3	-68	-7	5	100	-40	-22	-5
				100	-44	-4	2	100	-32	-7	0	99	-6	-6	1	-11	-39	-4	4	99	-38	-24	-6
2001-35-0049A	HAWAII		Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	100	-47	-10	0	100	-32	-7	0	99	-40	-8	-1	-35	-27	2	2	101	-38	-31	-6
				100	-48	-7	2	101	-39	-9	-1	99	-41	-8	3	-40	-53	-2	2	100	-51	-31	-7
2001-35-0052A	HAWAII		Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	100	-2	-9	1	100	-26	-16	0	100	-12	-11	-1	3	-41	-6	-1	100	-32	-26	-9
				99	-23	-11	0	101	-19	-8	-3	99	-23	-9	-1	-33	-58	-5	0	100	-47	-23	-8
2001-35-0054A	HAWAII		Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	-23	-4	-14	-1	-14	-37	-10	-1	95	-25	-16	1	-16	-15	-18	0	99	-10	-29	-6
				-20	-23	-12	1	-32	-44	-11	-3	16	-26	-16	1	10	-49	-12	0	99	-31	-28	-7
2001-35-0063A	HAWAII		Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	12	-18	-7	0	99	-28	-5	1	4	-29	-12	0	-44	-30	-1	2	100	-19	-26	-7
				12	-21	-8	1	99	-34	-3	-1	67	-31	-4	0	-29	-57	5	2	99	-25	-24	-8
2001-35-0119A	HAWAII		Pseudonocardia alaniniphila YIM 16303(T)	5	3	-11	-6	-29	-13	-8	2	-18	9	-11	-4	-26	-39	-8	0	99	-17	-17	-9
				1	-1	-10	1	-9	-21	-4	-2	6	-10	-10	-5	25	16	-13	0	26	-27	-20	-12
2001-35-0196A	HAWAII		Pseudonocardia acaciae GMKU095(T)	1	0	-11	-3	19	30	-8	1	15	12	-14	1	22	5	-12	1	22	-17	-21	-10
				-1	-51	-12	-2	4	-10	-2	-3	11	-14	-9	-1	22	2	-18	0	25	-35	-16	-11
2001-35-0140A	HAWAII		Saccharothrix texasensis NRRL B-16107(T)	5	-14	-9	-2	7	-7	-15	-1	13	-16	-16	1	54	8	-17	-1	20	-28	-22	-5
				-1	7	-1	-3	-14	-26	-9	-1	13	-1	-5	-1	44	17	-14	0	22	-28	-13	-11
2001-34-0245A	REUNION ISLAND		Actinomycespora chlorea TT071-57(T)	8	1	-6	-2	-12	-2	-12	5	-18	7	-10	-1	-13	-1	-11	-2	31	-38	-12	-10
				9	-11	-7	-2	-11	-14	-10	2	-4	8	-11	-1	-16	13	-11	-2	18	-31	-13	-11
2001-34-0342A	REUNION ISLAND		Actinomycespora lutea TT00-04(T)	5	14	-10	-6	-31	-14	-10	-1	4	1	-9	-4	-18	28	-14	-4	29	15	-19	-9
				2	16	-10	-4	-24	-18	-8	1	-15	7	-12	-5	-22	32	-14	-4	31	-19	-20	-12
2001-34-0353A	REUNION ISLAND		Actinomycespora lutea TT00-04(T)	5	7	-6	-5	-30	-16	-5	2	-20	11	-4	-4	-15	35	-10	-3	25	-24	-14	-11
				6	12	-9	-5	-24	-18	-4	0	-13	9	-7	-4	-30	25	-9	-4	21	-17	-17	-10
2001-34-0068A	REUNION ISLAND		Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	99	38	-22	3	-21	-4	-13	2	99	27	-18	1	-37	-8	-12	-2	99	40	-16	-2
				100	52	-30	4	100	-9	-16	1	99	25	-22	3	-44	-15	-12	-1	98	53	-13	6
2001-34-0082A	REUNION ISLAND		Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	100	64	-34	13	99	38	-16	5	100	40	-19	6	-39	-37	-11	-1	100	15	-18	3
				100	82	-27	36	100	46	-20	6	99	53	-23	6	-34	-26	-19	0	99	26	-15	5
2001-34-0203A	REUNION ISLAND		Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	5	-14	-6	0	-8	-6	-3	4	-1	-5	-8	0	-50	-46	-14	3	20	-49	-18	-9
				-1	-8	-11	0	-14	-14	-10	4	-11	4	-10	1	-38	-42	-12	2	27	-41	-16	-9
2001-34-0359A	REUNION ISLAND		Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	-2	3	-8	-4	-31	-14	-8	2	-21	-4	-8	-2	-49	-15	-13	-3	20	-24	-19	-11
				-10	10	-11	-5	-26	-10	-9	3	-17	2	-10	-1	-46	-11	-9	-2	17	-18	-17	-12
2001-34-0079A	REUNION ISLAND		Amycolatopsis leixingtonensis NRRL B-24131(T)	-5	-6	-10	-4	-32	-13	-9	4	0	-20	-15	-1	-37	-41	-11	-1	21	-19	-19	-12
				-1	-1	-12	-3	-28	-16	-9	-1	97	2	-14	-1	-33	-16	-11	-1	13	-19	-22	-12
2001-34-0266A	REUNION ISLAND		Amycolatopsis thermalba SF45(T)	12	6	-6	-4	-21	-15	-5	-2	-11	22	-9	-3	-30	-29	-11	-2	34	5	-16	-5
				10	5	-7	-3	-12	-22	-3	-2	-7	13	-5	-3	-33	1	-7	-3	34	-10	-12	-6
2001-34-0267A	REUNION ISLAND			11	-17	-10	-4	-27	-19	-7	-3	-16	-8	-8	-4	-17	15	-5	-3	38	-45	-20	-9
				13	-9	-10	-5	-22	-21	-6	-3	-18	-2	-9	-5	-15	12	-9	-3	27	-48	-20	-11

CEPA	ORIGEN	MEDIO	FR-23				FRM				GOT				KHC				YME			
			EPI167	CLS973	PAO_1_5919	MY1055	EPI167	CLS973	PAO_1_5919	MY1055	EPI167	CLS973	PAO_1_5919	MY1055	EPI167	CLS973	PAO_1_5919	MY1055	EPI167	CLS973	PAO_1_5919	MY1055
2001-34-0014A	ALASKA	Pseudonocardia alni DSM 44104(T)	10	8	-29	-2	2	4	-16	-3	-43	21	-33	-5	23	6	-11	-2	7	11	-1	-4
			14	12	-21	-3	5	0	-19	-1	-73	22	-33	1	26	12	-9	-3	-3	17	4	-4
2001-34-0015A	ALASKA	Pseudonocardia alni DSM 44104(T)	23	15	-28	-2	11	-4	-22	-3	-42	35	-29	-2	29	19	-13	-4	-1	18	0	-5
			17	17	-23	-3	8	0	-19	-2	-32	35	-37	3	29	25	-7	-4	-2	29	-1	-6
2001-34-0017A	ALASKA	Pseudonocardia alni DSM 44104(T)	6	-12	-31	-6	8	-49	-26	-1	-40	38	-32	0	28	22	-13	-2	-15	25	-3	-5
			6	-2	-31	-5	12	-34	-27	-1	-42	38	-41	1	27	31	-9	-3	-15	35	-5	-4
2001-34-0242A	ALASKA	Pseudonocardia alni DSM 44104(T)	-11	-13	-24	0	-4	-35	-18	-2	-53	27	-32	-3	16	8	-9	-2	1	-19	0	-4
			-6	-8	-18	0	0	-2	-21	-1	-58	23	-32	0	-3	8	-9	-2	-6	-27	2	-3
2001-35-0026A	HAWAII	Amocolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	100	-43	-26	-3	-12	-47	-49	-2	100	5	-56	-3	15	-41	-10	1	100	-34	-8	-3
			99	-41	-28	-3	-18	-53	-48	-1	99	-8	-67	-3	28	-22	-12	3	99	-34	-6	-1
2001-35-0020A	HAWAII	Amocolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	10	-18	-33	-4	-64	-35	-38	0	-74	3	-38	2	3	-36	-15	1	-15	-20	-13	-3
			99	20	-20	-5	-67	-46	-44	0	99	2	-24	-2	3	-29	-15	-1	99	-46	-4	0
2001-35-0021A	HAWAII	Amocolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	10	7	-32	-6	-70	-27	-40	0	-64	-18	-41	2	-5	-19	-18	0	-15	-16	-14	-4
			9	-25	-32	-6	-70	-29	-40	-1	-61	5	-41	1	-9	-41	-20	1	-13	-11	-14	-5
2001-35-0023A	HAWAII	Amocolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	-12	-11	-4	1	28	-56	-37	4	99	-27	-37	1	-28	-48	-17	6	100	-39	-4	1
			-21	-36	-10	0	32	-62	-35	3	100	-34	-46	-1	-23	-42	-13	4	100	-41	-5	1
2001-35-0024A	HAWAII	Amocolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	-16	-31	-31	4	14	21	-24	4	-59	-32	-43	3	4	-49	-19	4	100	-42	-4	2
			-21	1	-31	4	22	19	-11	4	-28	-30	-49	3	7	-41	-16	5	101	-35	-8	2
2001-35-0025A	HAWAII	Amocolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	97	4	-14	2	100	24	-7	4	99	-20	-28	6	-16	-1	-12	3	100	23	0	2
			97	-15	-14	3	100	8	-12	4	100	-34	-28	3	-21	0	-9	3	99	8	-2	2
2001-35-0029A	HAWAII	Amocolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	-27	4	-17	-1	87	-62	-35	0	100	-35	-40	-2	-21	-32	-10	1	100	-34	-8	-1
			-32	-28	-14	-2	99	-52	-34	1	-69	-36	-35	-2	-12	-48	-6	2	-34	-21	-9	-2
2001-35-0032A	HAWAII	Amocolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	-32	-27	-17	-1	-92	-59	-43	1	100	-31	-42	-2	-22	-31	-14	1	100	-36	-10	-1
			99	-53	-26	-3	-77	-63	-44	-1	100	-18	-47	-3	-24	-27	-13	1	-30	-38	-13	-3
2001-35-0037A	HAWAII	Amocolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	107	-19	-30	18	-43	-58	-43	0	100	-36	-47	-2	-19	-36	-18	1	33	-19	-14	-2
			99	-51	-33	-2	-19	-41	-43	-1	100	-19	-53	-3	42	-13	-20	0	99	-20	-10	-3
2001-35-0039A	HAWAII	Amocolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	30	-13	-17	0	99	-47	-36	0	100	-31	-52	-1	42	-16	-17	1	101	-38	-11	-1
			100	-13	-29	-1	-31	-37	-43	0	100	-24	-62	-1	51	-24	-24	0	99	-27	-10	-1
2001-35-0046A	HAWAII	Amocolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	-8	-16	-7	0	99	-49	-21	4	100	-20	-39	1	-22	-53	-16	5	99	-29	-6	1
			0	-46	-10	0	100	-51	-28	2	101	-7	-44	0	-21	-48	-13	4	99	-33	-9	0
2001-35-0049A	HAWAII	Amocolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	-22	-9	-6	-2	49	-61	-31	0	100	-27	-51	0	-15	-61	-6	3	100	-44	-1	0
			-13	-15	-11	4	99	-56	-29	2	-63	-34	-45	-1	-25	-54	-7	2	101	-60	0	1
2001-35-0052A	HAWAII	Amocolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	99	-63	-33	-3	100	-33	-34	0	100	-17	-44	-2	-27	-13	-12	1	99	-19	-13	-1
			99	-64	-33	-2	99	-36	-32	2	99	-25	-66	-3	-26	-34	-9	1	100	-48	-12	-1
2001-35-0054A	HAWAII	Amocolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	100	-33	-37	-3	100	-45	-40	0	100	-30	-51	-2	-18	-24	-12	2	100	-15	-13	-4
			99	-39	-32	-2	100	-42	-38	0	100	-25	-63	-3	-15	-32	-10	2	100	-38	-14	-2
2001-35-0063A	HAWAII	Amocolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	99	-31	-21	-1	99	-66	-33	1	100	-28	-41	-2	-25	-40	-11	2	39	-27	-4	-2
			99	-42	-18	-1	100	-56	-31	2	19	-38	-35	-3	-21	-34	-3	2	-36	-41	-2	-3
2001-35-0119A	HAWAII	Pseudonocardia alaniniphila YIM 16303(T)	99	-31	-22	-3	-49	-49	-40	-1	101	-24	-14	-5	-17	-11	-5	2	100	-51	-6	-3
			-25	-10	-47	1	-15	-32	-38	-1	-35	6	-47	-4	-7	-26	-21	6	-20	-28	-8	-4
2001-35-0196A	HAWAII	Pseudonocardia acaciae GMKU095(T)	-30	-3	-34	4	-16	-31	-40	-1	-52	-4	-43	-2	28	-44	-59	7	2	-18	-14	-3
			12	-9	-55	0	-27	-41	-35	-2	-45	-14	-44	-4	16	-46	-40	8	-5	-17	-12	-3
2001-35-0140A	HAWAII	Saccharothrix texasensis NRRL B-16107(T)	-37	-5	-30	-1	-9	-14	-49	-1	-60	-6	-47	-2	-16	-17	-50	-1	-6	-8	-17	-5
			-51	-7	-31	5	1	-38	-38	-2	-40	-11	-45	-2	-26	-35	-28	2	-37	-41	-11	-2
2001-34-0245A	REUNION ISLAND	Actinomycetospora chlora TT071-57(T)	-26	-6	-78	1	-34	11	-35	2	-52	-16	-35	-1	-28	-46	-50	7	4	-14	-8	-1
			30	10	-25	1	-45	4	-33	0	-49	25	-36	0	18	7	-8	1	-2	-20	-9	-1
2001-34-0342A	REUNION ISLAND	Actinomycetospora lutea TT00-04(T)	22	24	-36	-7	-54	-55	-41	0	-13	37	-41	-2	30	23	-17	1	1	-18	-12	-5
			23	31	-34	-6	-66	-51	-42	0	11	40	-44	0	35	21	-16	-1	-2	-36	-11	-4
2001-34-0353A	REUNION ISLAND	Actinomycetospora lutea TT00-04(T)	20	33	-30	-4	-42	-52	-38	0	2	38	-38	1	29	23	-12	2	3	-19	-7	-4
			-39	2	-16	-5	-42	-34	-38	1	9	39	-42	1	31	24	-13	2	2	-34	-8	-4
2001-34-0068A	REUNION ISLAND	Amocolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	-21	-8	-23	-4	-49	-53	-43	-3	100	64	-17	17	-4	-22	-12	2	100	-44	0	2
			4	5	-21	-3	-31	-48	-37	-2	100	1	-34	0	-9	-26	-8	1	100	2	-7	1
2001-34-0082A	REUNION ISLAND	Amocolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	-18	-6	-15	-2	-44	-62	-34	0	100	90	-15	67	4	-21	-11	3	101	-67	5	11
			-13	-8	-16	-3	-44	-63	-37	0	100	57	-20	6	1	-20	-12	2	101	-44	-5	8
2001-34-0203A	REUNION ISLAND	Amocolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	2	-46	-28	-3	-77	-48	-30	3	-89	-24	-29	3	-20	-26	-16	3	-8	-51	-10	-2
			7	-45	-24	-4	-77	-47	-38	3	-56	-21	-37	2	-26	-39	-14	4	-11	-51	-9	-2
2001-34-0359A	REUNION ISLAND	Amocolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	5	-30	-33	-6	-67	-41	-39	0	-59	-7	-38	0	-20	-34	-16	0	-14	-40	-13	-4
			5	-26	-33	-6	-67	-45	-38	1	-83	-2	-37	-2	-30	-31	-17	0	-13	-34	-14	-4
2001-34-0079A	REUNION ISLAND	Amocolatopsis lexingtonensis NRRL B-24131(T)	15	-22	-33	-5	-75	-46	-38	1	-19	-29	-33	-4	2	-9	-16	1	-17	-31	-11	-2
			11	-9	-33	-2	-54	-49	-41	1	-63	-17	-38	-3	-9	-39	-16	1	-14	-40	-16	-3
2001-34-0266A	REUNION ISLAND	Amocolatopsis thermalba SF45(T)	12	-7	-21	-2	-92	-54	-41	0	-106	0	-36	-1	7	-40	-13	3	-7	-16	1	0
			11	-4	-18	-1	-76	-44	-41	1	-69	1	-38	0	5	-29	-9	2	-7	-30	0	-1
2001-34-0267A	REUNION ISLAND		23	9	-29	-4	-51	-47	-42	1	-18	23	-41	2	18	6	-16	3	4	-42	-5	-3
			25	12	-29	-5	-54	-50	-42	1	-30	21	-40	3	18	7	-15	2	5	-50	-5	-4

Tabla 25d: actividades detectadas para cada cultivo crecido en medio líquido a 14 días de incubación. Los números indican el porcentaje de inhibición para cada una de las cepas de ensayo (*Staphylococcus aureus* EPI167 / *Acinetobacter baumannii* MB5973 / *Pseudomonas aeruginosa* PAO5919 / *Candida albicans* MY1055).

CEPA	ORIGEN	MEDIO ESPECIE MÁS CERCANA (Etaxon)	DEF-15				DEF-15S				DEF15-Sr				DNPM				FPY-12			
			EPI167	CLS973	PAO 1 5919	MY1055	EPI167	CLS973	PAO 1 5919	MY1055	EPI167	CLS973	PAO 1 5919	MY1055	EPI167	CLS973	PAO 1 5919	MY1055	EPI167	CLS973	PAO 1 5919	MY1055
2001-34-0014A	ALASKA	Pseudonocardia alni DSM 44104(T)	1 10	-5 11	-1 5	-4 -6	15 5	-11 16	-15 -1	-3 -4	10 5	-7 17	-10 -2	-4 -5	11 13	10 16	0 11	-5 -5	38 44	19 21	-6 -4	-7 -8
2001-34-0015A	ALASKA	Pseudonocardia alni DSM 44104(T)	8 11	14 -11	-2 -2	-6 -7	0 -10	19 31	-10 -8	-4 -4	-2 -6	25 36	-15 -9	-5 -5	14 9	23 31	-10 -5	-4 -5	44 43	27 34	-9 -7	-9 -9
2001-34-0017A	ALASKA	Pseudonocardia alni DSM 44104(T)	3 -46	-8 -34	-9 -13	-7 -2	0 -4	23 34	-14 -13	-5 -2	4 -9	-13 -14	-20 -14	-4 -4	7 -1	28 29	-9 -10	-5 -4	45 15	25 33	-11 -12	-7 -4
2001-34-0242A	ALASKA	Pseudonocardia alni DSM 44104(T)	-10 -35	-47 -41	-3 -6	0 -2	2 5	-15 12	-8 -5	1 0	8 7	12 13	-5 -1	-4 -4	-2 4	15 23	5 12	-4 -4	13 13	-8 5	3 4	-4 -4
2001-35-0026A	HAWAII	Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	100 99	-48 -23	-12 -14	-1 -1	100 99	-25 3	-14 -13	0 -1	99 100	-27 -27	-14 -17	1 2	100 99	-48 -41	-15 -13	-1 0	99 100	-41 -35	-32 -36	-8 -7
2001-35-0020A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	4 100	15 8	-1 -6	-4 0	-19 98	18 19	-7 -12	-2 1	-18 91	27 -28	-9 -15	-2 3	-41 -44	-21 12	-11 -9	-1 -1	20 27	-32 -42	-21 -19	-13 -12
2001-35-0021A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	-10 11	-8 8	-7 -2	-1 -4	27 -14	-28 27	-17 -8	0 -3	99 -14	-35 21	-22 -11	0 -2	-43 -47	3 -18	-14 -11	-2 -3	23 27	-30 -45	-27 -24	-14 -12
2001-35-0023A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	100 69	-38 -45	-10 -5	2 1	100 100	-42 -35	-26 -10	2 2	99 99	-39 -41	-23 -18	4 2	-28 -26	-53 -20	-11 -4	2 2	99 100	-49 -46	-26 -21	-1 -3
2001-35-0024A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	-1 -16	-49 -43	-5 -1	3 2	7 2	-49 3	-8 -5	0 0	6 4	-69 -67	-7 -4	2 2	-32 -15	-66 -48	4 12	3 1	93 99	-14 -33	2 -1	-2 -4
2001-35-0025A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	92 100	11 -35	-29 -21	-3 -3	96 100	-37 22	-10 -8	2 2	100 99	-2 -12	-13 -11	2 2	-39 -29	4 2	-10 -5	-1 -2	99 100	3 9	-22 -25	-3 -6
2001-35-0029A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	101 100	-19 -33	-6 -3	-2 0	100 99	-42 9	-11 -9	0 -1	99 99	-30 -27	-14 -16	-1 1	-17 -17	-30 -54	-2 6	0 -1	99 99	-23 -33	-22 -23	-4 -4
2001-35-0032A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	100 100	-36 -15	-13 -8	-2 -2	85 3	-32 -16	-14 -13	0 -1	100 100	-33 -10	-15 -17	-1 0	-29 -21	-56 -35	-9 -1	-1 0	100 100	-16 -40	-27 -27	-4 -5
2001-35-0037A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	100 100	-44 -19	-12 -9	0 -2	99 99	-20 -31	-16 -19	-1 -3	99 100	-58 -14	-19 -19	0 -2	100 43	-58 -51	-14 -5	-1 0	102 97	-41 -35	-32 -31	-7 -3
2001-35-0039A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	100 99	-30 -18	-13 -9	1 0	100 99	-4 -29	-21 -17	2 0	99 98	-19 -52	-20 -24	2 1	100 99	-40 -58	-19 -11	0 1	100 99	-21 -30	-28 -30	-4 -7
2001-35-0046A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	99 100	-44 -45	-9 -6	3 1	24 86	-24 -43	-23 -16	1 -2	84 98	-40 -44	-13 -19	2 2	-22 -22	-48 -58	-14 -10	2 2	100 107	-40 -45	-22 -25	-1 -3
2001-35-0049A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	100 99	-42 -48	-2 0	0 0	100 100	-39 -39	-3 -2	0 -1	98 99	-44 -45	-19 -12	0 0	-16 -16	-50 -59	8 6	-1 0	100 99	-45 -50	-10 -20	-6 -6
2001-35-0052A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	99 99	-2 -35	-10 -7	-2 -2	99 100	-25 -35	-10 -8	-1 -1	99 99	-24 -37	-1 -12	-1 -3	96 42	-51 -38	-2 -9	-2 -2	100 100	-50 -51	-13 -18	-3 -4
2001-35-0054A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	-5 23	-46 -40	-9 -10	-4 -4	100 6	-42 -31	-17 -14	0 0	92 18	1 -53	-21 -19	0 -2	-26 -36	-34 -23	-9 -11	-2 -2	100 99	-16 -33	-28 -28	-5 -5
2001-35-0063A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	20 11	-19 -16	-6 0	-1 0	8 -11	-8 11	-10 -6	0 -1	89 37	-4 -25	-16 -15	0 0	-16 -16	-39 -40	1 5	0 -1	99 99	-34 -42	-24 -23	-4 -4
2001-35-0119A	HAWAII	Pseudonocardia alaniiphila YIM 16303(T)	99 2	-47 5	-4 -1	-1 -3	101 -14	5 -38	-14 -11	-4 -4	99 -1	14 -26	-24 -16	0 -8	-17 4	-34 18	3 -15	-2 -2	100 34	-30 -19	-12 -21	-4 -8
2001-35-0196A	HAWAII	Pseudonocardia acaciae GIMU095(T)	10 3	7 4	-6 -2	-2 -3	19 -7	-48 -17	-16 -11	-4 -4	15 17	23 -18	-16 -16	-1 -2	-6 15	-26 4	-15 -18	-1 -3	37 36	-30 -23	-22 -21	-9 -9
2001-35-0140A	HAWAII	Saccharothrix texensis NRRL B-16107(T)	3 3	-4 -8	-2 -3	-3 -3	-7 -2	-15 -28	-16 -13	-4 -3	-1 11	-9 -28	-17 -11	-2 -2	2 7	-10 26	-19 -20	-3 -2	29 29	-30 -19	-18 -20	-10 -9
2001-34-0245A	REUNION ISLAND	Actinomycespora chlora TT071-57(T)	15 23	-3 6	-3 2	0 -2	6 -9	-31 7	-17 -9	-2 -2	-14 -14	11 5	-13 -5	-1 -2	30 11	-10 7	-19 -6	1 -2	34 36	2 -1	-21 -19	-10 -11
2001-34-0342A	REUNION ISLAND	Actinomycespora lutea TT00-04(T)	9 8	33 16	-4 -4	-7 -5	20 21	5 4	-9 -5	-6 -5	-21 11	39 -17	-10 -6	-5 -4	-25 -23	28 36	-14 -11	-6 -5	32 34	-28 -33	-20 -15	-13 -8
2001-34-0353A	REUNION ISLAND	Actinomycespora lutea TT00-04(T)	10 14	23 17	2 0	-2 -2	7 -3	99 23	-25 23	-10 -7	-2 3	-23 -18	-12 10	-1 0	-23 -27	33 35	-8 3	-4 -5	34 22	-24 -36	-15 -16	-12 -11
2001-34-0068A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	100 100	65 68	-35 -33	0 -1	99 36	52 33	-23 -12	6 1	99 99	-3 28	-27 -26	1 3	-42 -44	-11 -25	-13 -14	-3 -3	99 99	-1 52	-8 4	3 15
2001-34-0082A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	100 99	79 79	-35 -18	22 40	101 13	54 -2	-21 -15	10 0	99 98	-29 23	-25 -29	13 5	-44 100	10 -64	-16 1	-2 1	100 101	39 62	-12 -13	11 6
2001-34-0203A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	10 17	8 -10	-10 -6	3 -1	-12 44	-35 -29	-23 -14	4 1	0 46	-32 -38	-27 -21	4 2	-43 -51	-16 -23	-18 -14	1 -1	19 27	-55 -56	-27 -28	-10 -10
2001-34-0359A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	5 6	30 -22	0 1	-4 -3	99 21	-10 28	-11 -10	-3 -1	-9 -14	-7 32	-9 -7	-2 -2	-51 -48	-18 -18	-13 -10	-3 -2	21 23	-32 -37	-19 -17	-12 -12
2001-34-0079A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis levingtonensis NRRL B-24131(T)	-2 4	-7 -29	-4 0	-1 -2	-20 17	14 -18	-11 -13	-3 0	45 86	-3 14	-22 -18	2 1	-46 -44	-27 -24	-12 -11	-2 -4	19 28	-25 -32	-23 -20	-12 -12
2001-34-0266A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis thermalba SF45(T)	26 23	2 -13	2 4	-4 -4	-8 -3	26 11	-4 -1	-5 -5	-9 -5	21 24	-3 -4	-5 -5	-2 2	18 -21	-6 -4	-4 -2	33 32	-17 -32	-12 -10	-6 -6
2001-34-0267A	REUNION ISLAND		25 32	13 -26	1 5	-1 -7	-10 -9	15 15	-3 1	-6 -6	6 -10	20 6	-3 3	-4 -6	-13 -5	15 11	5 5	-5 -5	29 37	-54 -51	-11 -10	-12 -13

CEPA	ORIGEN	MEDIO ESPECIE MÁS CERCANA (Etaxon)	FR-23				FRM				GOT				KHC				YME			
			EP167	CL5973	PAO 1 5919	MY1055	EP167	CL5973	PAO 1 5919	MY1055	EP167	CL5973	PAO 1 5919	MY1055	EP167	CL5973	PAO 1 5919	MY1055	EP167	CL5973	PAO 1 5919	MY1055
2001-34-0014A	ALASKA	Pseudonocardia alni DSM 44104(T)	20	7	6	-11	18	1	-11	-3	-14	8	-18	-11	20	2	3	-6	-17	13	14	-7
			24	12	7	-11	19	-1	-1	-1	-13	9	-4	-9	20	5	12	-6	-14	16	19	-7
2001-34-0015A	ALASKA	Pseudonocardia alni DSM 44104(T)	6	-5	-3	-7	12	-32	-16	1	-29	20	-17	-8	13	11	-3	-6	-21	21	1	-5
			1	19	1	-7	11	16	-8	-1	-17	21	-12	-10	4	16	1	-8	-16	27	0	-7
2001-34-0017A	ALASKA	Pseudonocardia alni DSM 44104(T)	-1	-38	-10	-6	25	-39	-19	0	-19	22	-21	-5	7	15	-12	-5	-23	21	-6	-3
			-4	-33	-6	-3	20	-31	-16	0	-10	34	-15	-4	8	23	-7	-6	-19	33	-5	-3
2001-34-0242A	ALASKA	Pseudonocardia alni DSM 44104(T)	-3	-8	-2	-4	8	-11	-7	-2	-22	10	-15	-13	-28	-2	6	-2	-20	-27	13	-4
			0	-29	-2	-3	17	-27	-10	-1	-22	12	-3	-7	15	5	13	-5	-20	1	15	-4
2001-35-0026A	HAWAII	Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	100	12	-5	-5	100	-34	-30	1	99	1	-29	-3	29	-48	-13	0	100	-17	-11	-1
			100	-42	-12	-3	39	-39	-31	2	99	-9	-43	-2	24	-40	-11	2	100	-32	-9	0
2001-35-0020A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	15	9	-14	-8	-39	-66	-37	0	-35	-49	-27	0	-25	-56	-12	-1	-19	-34	-13	-2
			13	9	-16	-8	-39	-57	-38	0	100	41	-22	0	18	-62	-17	2	99	-37	-6	1
2001-35-0021A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	12	20	-16	-10	-41	-66	-40	1	-37	-47	-33	-2	97	-65	-21	3	101	0	-5	0
			12	19	-17	-11	-38	-61	-41	0	-36	-39	-23	-1	-28	-54	-18	-1	-13	-33	-17	-3
2001-35-0023A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	-5	-4	-10	-3	99	-55	-15	3	100	-65	-36	0	-19	-72	-12	5	101	-43	-16	2
			-10	-12	-4	-4	99	-60	-13	1	99	-49	-18	-2	-14	-71	-11	2	101	-45	-3	1
2001-35-0024A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	-20	-15	2	-1	11	9	9	1	-7	-86	-33	0	-19	-77	10	2	50	-54	13	0
			-25	-10	3	0	5	15	6	1	-31	-107	-26	0	-18	-81	14	2	1	-46	11	0
2001-35-0025A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	-38	7	7	-1	100	32	5	5	101	29	-23	7	-34	-38	-5	1	100	23	2	3
			-21	8	0	-3	100	11	9	3	100	-43	-7	4	-38	-31	1	1	100	25	4	3
2001-35-0029A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	-11	21	3	-1	100	-48	-8	1	100	-53	-27	-1	-11	-54	-7	3	100	-36	-4	0
			-56	-26	4	-3	100	-48	-3	1	100	-64	-13	-1	-16	-68	-1	3	100	-40	3	0
2001-35-0032A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	-9	23	-1	-5	99	-43	-12	0	100	-38	-35	-2	-15	-31	-12	2	100	-21	-8	0
			13	-15	0	-3	100	-46	-11	0	99	-55	-17	-2	-30	-57	-6	0	100	-6	-5	-1
2001-35-0037A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	97	-60	-4	0	6	-36	-22	-2	99	-55	-43	-1	101	-62	-17	2	23	-12	-15	0
			98	-48	-6	-1	8	-31	-20	-1	100	-35	-45	0	100	-74	-17	3	3	-8	-21	-1
2001-35-0039A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	-7	2	-7	19	99	-37	-23	0	100	-45	-31	0	100	-38	-22	2	97	-23	-9	0
			100	-20	-19	-3	41	-34	-24	-2	100	-18	-38	-2	97	-46	-21	1	49	3	-14	-2
2001-35-0046A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	-25	-6	-10	-3	100	-46	-13	2	100	-45	-41	0	-11	-74	-7	4	100	-48	-12	3
			-60	-28	-6	-3	100	-28	-11	-1	100	-44	-41	-1	-11	-70	-7	3	99	-51	-5	1
2001-35-0049A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	0	8	9	-6	100	-83	-1	-1	100	-57	-33	-3	-5	-73	8	2	100	-49	5	-2
			-11	4	9	-4	100	-74	3	0	100	-48	-23	-3	-4	-78	8	2	100	-48	13	-1
2001-35-0052A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	99	0	4	-3	99	-52	-8	-1	99	-52	-8	-3	-3	-43	-7	0	100	-15	-7	-1
			22	8	5	-5	99	-57	-5	-1	100	-59	-8	-2	3	-46	2	1	100	-34	-3	-2
2001-35-0054A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	-15	21	-3	-4	100	-70	-10	1	100	-63	-9	-2	-16	-26	-10	1	100	-37	-4	-1
			100	11	2	-2	100	-61	-7	1	99	-74	-11	-1	-16	-46	-4	2	99	-22	-5	-1
2001-35-0063A	HAWAII	Amycolatopsis pretoriensis NRRL B-24133(T)	24	6	4	-4	100	-37	-11	0	100	-72	-8	-1	-21	-31	-10	0	45	-27	1	0
			34	-9	6	-4	100	-99	-3	1	34	-42	-16	-1	-20	-44	-3	1	1	-45	2	-1
2001-35-0119A	HAWAII	Pseudonocardia alaniniphila YIM 16303(T)	-48	8	-3	-4	100	-48	-8	0	99	-49	-21	-2	-21	-45	-9	3	56	-34	-4	-1
			-7	38	-32	8	23	-31	-27	-1	-21	-29	-28	-3	9	-5	-17	3	12	-33	-27	-2
2001-35-0196A	HAWAII	Pseudonocardia acaciae GMKU095(T)	-16	3	-47	7	19	-18	-29	-2	-14	-16	-34	-3	-11	-31	-23	8	25	-26	-34	-2
			-27	4	-12	6	22	-58	-30	-1	-28	-22	-11	-3	26	-53	-20	2	23	-33	-34	-2
2001-35-0140A	HAWAII	Saccharothrix taxensis NRRL B-16107(T)	34	17	-10	-1	15	-18	-37	-2	3	-37	-17	-3	-3	-63	-21	-1	0	-24	-30	-2
			5	25	-8	-2	20	-46	-28	-1	2	-10	-30	-4	21	-59	-19	0	5	-31	-21	-2
2001-34-0245A	REUNION ISLAND	Actinomycetospora chora TT071-57(T)	24	-3	-18	-8	6	-1	-34	0	-1	7	-30	-3	9	0	-10	-1	19	-7	-29	1
			22	0	-12	-6	-1	-4	-17	-1	-2	5	-16	-6	12	-7	-2	0	19	15	5	-2
2001-34-0342A	REUNION ISLAND	Actinomycetospora lutea TT00-04(T)	35	1	-16	-12	-22	14	-37	-2	4	32	-22	-8	10	-51	-11	1	3	29	-9	-6
			37	14	-15	-10	-21	3	-35	-1	-3	19	-17	-4	25	19	-8	-3	19	-21	-4	0
2001-34-0353A	REUNION ISLAND	Actinomycetospora lutea TT00-04(T)	99	-5	-15	-5	-25	-7	-32	0	-2	27	-22	-5	17	17	-9	-1	20	-44	-4	1
			99	21	0	-4	-17	12	-32	-1	-1	23	-14	-5	19	10	-6	-2	20	-33	-1	-1
2001-34-0068A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	30	19	-8	-4	99	71	-25	15	100	100	-15	91	-23	-55	-18	1	99	-41	0	3
			99	-7	-9	-2	99	100	-17	42	100	101	-16	78	-16	-52	-10	0	100	-24	-4	2
2001-34-0082A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	96	17	-1	-4	100	86	-26	42	100	100	-26	96	-1	-67	-19	2	100	50	-1	7
			99	-27	-18	-1	99	88	-41	41	100	100	-14	87	-6	-59	-17	3	101	47	1	6
2001-34-0203A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	-7	-8	-17	-8	-41	-46	-36	1	-43	-38	-31	3	-37	-39	-22	3	100	-24	-22	4
			11	0	-23	-10	-43	-61	-39	1	-30	-48	-27	2	-38	-36	-20	2	101	-21	-10	2
2001-34-0359A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis kentuckyensis NRRL B-24129(T)	-20	-13	-4	-6	-43	-60	-37	1	-28	-35	-26	-2	75	-75	-11	3	4	-22	-9	-3
			7	-47	-15	-9	-45	-51	-34	0	-27	-39	-17	-1	99	-25	-11	2	27	-33	-10	-3
2001-34-0079A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis levingtonensis NRRL B-24131(T)	14	4	-16	-11	-42	-75	-37	1	100	-44	4	0	-26	-68	-18	0	-20	-45	-14	-1
			13	-7	-15	-9	-37	-60	-37	0	99	-55	-16	-2	-31	-50	-14	0	-15	-34	-12	-3
2001-34-0266A	REUNION ISLAND	Amycolatopsis thermalba SF45(T)	33	44	6	-10	11	-59	-26	0	-25	-30	-16	-2	0	-56	-7	0	13	-28	0	-1
			31	44	9	-7	11	-51	-24	0	-16	0	-9	-3	2	-57	0	0	25	-15	5	-1
2001-34-0267A	REUNION ISLAND		39	-1	-4	-11	-24	-16	-27	-1	0	12	-13	-8	13	1	3	0	8	-31	3	-4
			36	7	-6	-11	-22	-10	-26	-2	1	7	-12	-8	8	1	4	1	19	-2	7	-4

En cuanto a los medios de fermentación, de los 10 medios utilizados, aquellos en los que se obtuvo un mayor número de actividades fueron el FPY-12 con 52 extractos activos, YME con 51, DEF 15-Sc con 49 y GOT con 47. En el lado opuesto, los que dieron lugar a un menor número de actividades fueron KHC con 11 caldos activos, y DNPM con sólo 8 activos. El número total de actividades para cada medio, así como las detectadas a 7 y 14 días de incubación, puede verse en la **Tabla 26**.

Tabla 26: Número total de actividades para cada medio y para los dos tiempos de incubación.

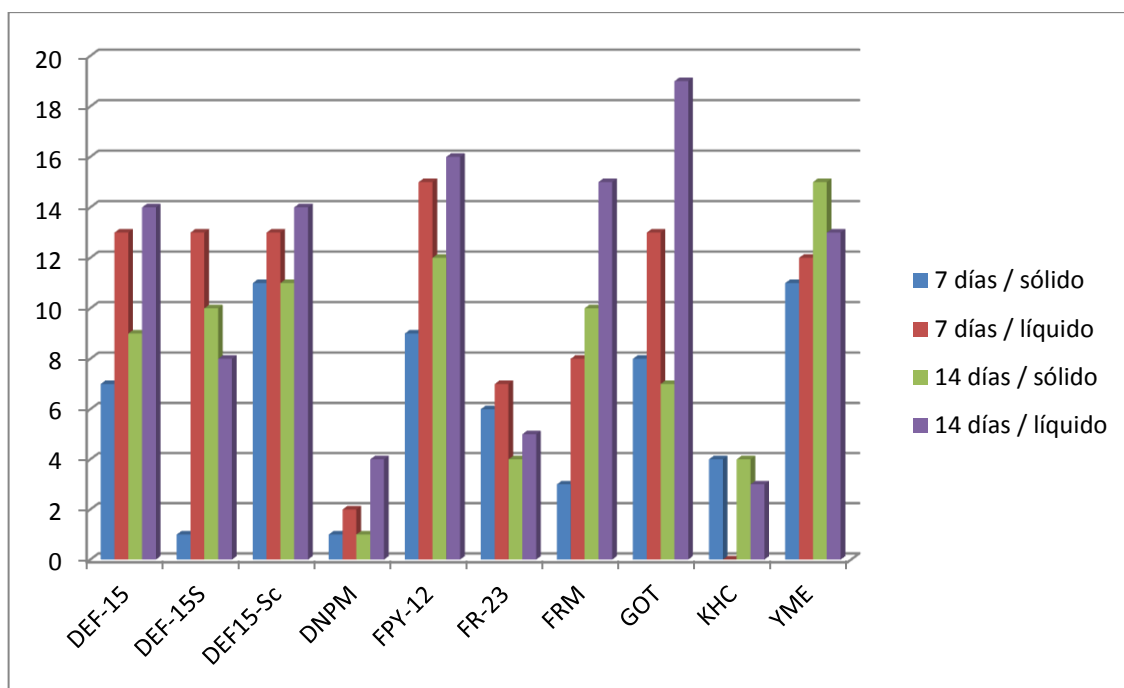
MEDIO	7 días	14 días	TOTAL	%
DEF-15	20	23	43	12,3
DEF-15S	14	18	32	9,1
DEF15-Sc	24	25	49	14,0
DNPM	3	5	8	2,3
FPY-12	24	28	52	14,8
FR-23	13	9	22	6,3
FRM	11	25	36	10,3
GOT	21	26	47	13,4
KHC	4	7	11	3,1
YME	23	28	51	14,5
TOTAL	157	194	351	

En todas las condiciones y medios ensayados se detectaron actividades con la excepción del medio KHC líquido, a 7 días de incubación, en donde ninguno de los cultivos ensayados produjo ninguna actividad (**Tabla 25c** y **Gráfica 2**).

Es interesante destacar que los medios que produjeron mayor número de actividades presentan en su composición fuentes de carbono simples, monosacáridos como fructosa y/o glucosa (FPY-12, YME) o disacáridos como sacarosa (DEF-15, DEF15-Sc). Sin embargo, aquellos medios que contienen fuentes de carbono más complejas como dextrina de maiz o almidón de patata, son los que menos actividades produjeron (DNPM, KHC, FR-23). En una situación intermedia están los medios GOT y FRM que tienen una fuente de carbono simple como es el glicerol pero que también contienen fuentes complejas como harina de avena (GOT) o dextrina de maiz (FRM). Llama también la atención el caso de los medios DEF15-Sc y DEF-15, cuya única diferencia en composición es la adición de escandio, que parece mejorar el número de actividades que se detectan. También hay que reseñar el caso del medio DEF-15S, en el que se observa un menor número de actividades con respecto a DEF15-Sc y DEF-15, y cuya diferencia en composición es una menor cantidad de sacarosa (5 g/l frente a 40 g/l) y la incorporación de una fuente de carbono compleja como almidón de patata (20 g/l). Una situación similar ocurre con el medio FR-23, en el que a pesar de llevar una fuente de carbono sencilla como glucosa (5 g/l) no se detectan muchas actividades, hecho que podría explicarse por llevar también almidón de patata como fuente de carbono principal (30 g/l).

Con respecto a las fuentes de nitrógeno, no se observa una correlación entre la complejidad de las fuentes empleadas y el número de actividades observadas porque hay medios con fuentes complejas (peptona, amíaca, extracto de levadura) que producen muchas actividades (FPY-12, YME) mientras que otros producen pocas (KHC, DNPM, FRM) o medios que han producido muchas actividades (DEF15-Sc, DEF-15) que contienen fuentes de nitrógeno simples (NH_4Cl).

Gráfica 2: Número total de actividades por medios para cada una de las condiciones de fermentación.



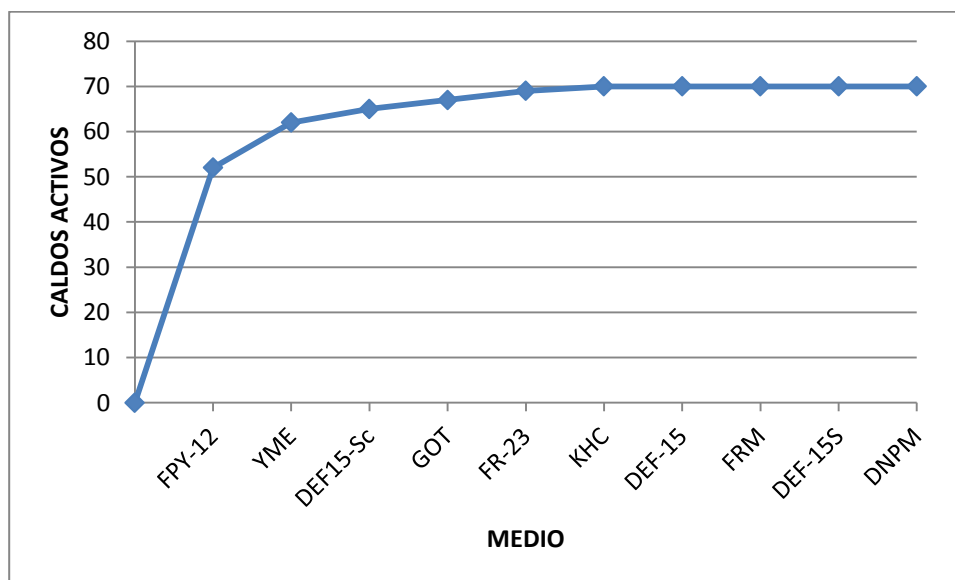
Por otro lado, de los 18 cultivos que fueron activos inicialmente al ensayar sus tacos de agar en medio YME, 12 de ellos repitieron su actividad al ensayarse en el medio YME sólido, en 10 de los cultivos, a 7 y 14 días y los otros dos, sólo a 14 días. Otros 3 de los 18 cultivos activos en taco, no fueron activos en YME sólido pero sí en líquido, uno de ellos (2001-35-0025A) a 7 y 14 días, otro a 7 días (2001-35-0024A) y otro a 14 días (2001-35-0203A). Dos de los cultivos, 2001-35-0020A y 2001-35-0021A fueron activos en YME líquido a 7 ó 14 días pero no de forma repetida en el duplicado de cada cepa sino sólo en alguna de ambas y por ello no se han considerado activos. Por último, la cepa 2001-34-0079A fue activa en otras condiciones (DEF 15-Sc líquido a 14 días y en GOT sólido y líquido a 14 días).

En la [Gráfica 3](#), podemos ver una curva de actividades acumuladas en donde se aprecia la contribución que cada medio hace con actividades únicamente detectadas en ese medio al global de actividades detectadas, considerándose como actividad única aquella que se detecta solamente en una condición de fermentación única (tipo de medio, sólido o líquido, tiempo de incubación) frente a un microorganismo diana distinto. Para

construir esta gráfica, ordenamos los medios en función del número de actividades producidas de mayor a menor. En este caso partimos del medio FPY-12 que es el que mayor número de actividades ha producido. En segundo lugar tenemos el medio YME, y del total de actividades producidas por este medio, eliminamos aquellas que sean comunes con el medio anterior, quedándonos sólo con aquellas actividades no producidas en FPY-12. A continuación, hacemos lo mismo con el tercer medio, DEF 15-Sc, eliminando las actividades comunes con los medios anteriores y sólo considerando las actividades únicas producidas por el nuevo medio, y así continuamos sucesivamente con los demás medios. De esta forma lo que vemos es qué nuevas actividades estamos obteniendo por la incorporación de un nuevo medio al conjunto de fermentaciones.

El medio con mayor número de caldos activos es el FPY-12 con 52 actividades en total, aunque 50 de éstas se pueden encontrar en otros medios y sólo 2 de ellas se detectan únicamente en este medio. En el medio YME se observa un total de 51 actividades pero 6 de ellas no se observan en el medio FPY-12, con lo que la utilización del medio YME hace que se detecten 6 nuevas actividades. La misma situación ocurre con los sucesivos medios, en donde vemos que el medio DEF 15-Sc contribuye con 3 nuevas actividades no detectadas ni en FPY-12 ni en YME. El medio GOT contribuye con 2 nuevas actividades no vistas en ninguno de los 3 medios anteriores. La utilización del medio FR23 añade 2 actividades nuevas. Por último, el medio KHC, a pesar de ser uno de los medios en los que se detecta menor número de actividades, aporta 1 actividad nueva no detectada en ningún otro medio. El resto de medios, aunque presentan actividades, ninguna de ellas es exclusiva de ese medio ya que se han detectado previamente en alguno de los medios anteriores. En consecuencia, utilizando estos 6 medios, podemos producir todas las actividades detectadas, mientras que la incorporación de los otros 4 medios, no aporta nuevas actividades (**Gráfica 3**).

Gráfica 3: Curva de actividades acumuladas según las actividades únicas de cada medio.



4.12.1.2. Detección de metabolitos conocidos mediante LC-MS en los extractos activos.

Los 351 caldos activos se sometieron a un análisis de LC-MS para tratar de detectar algún metabolito conocido, mediante la comparación de sus perfiles de LC-MS con los perfiles de metabolitos secundarios con actividades antimicrobianas descritas, almacenados en una base de datos generada en el laboratorio. Esta base de datos, contiene los datos de LC-MS de más de 800 productos naturales con actividad antimicrobiana. En el caso de encontrar alguna coincidencia con alguna entrada de la base de datos, podríamos en principio pensar que la actividad detectada pudiera deberse a ese metabolito detectado, comparando a la vez las actividades detectadas en el caldo de cultivo y las propiedades descritas para ese metabolito, aunque esta hipótesis tendría que ser confirmada mediante el aislamiento y purificación del compuesto responsables de la actividad. Por el contrario, si en los caldos activos no detectamos ningún compuesto conocido, podemos pensar, en primer lugar, que la actividad se debe a un metabolito conocido que no está presente en la base de datos o bien que podría tratarse de una nueva molécula no descrita. Cualquiera de estas dos hipótesis tendría que confirmarse mediante el aislamiento de la molécula responsable de la actividad y posteriormente, la elucidación de su estructura química. En la [Tabla 27](#) están resumidas las actividades de las cepas de *Pseudonocardia* ensayadas en las microfermentaciones y en el ensayo con tacos de agar, junto con la detección de ruta(s) biosintética(s) y análisis de LC-MS.

De las 20 cepas que fueron activas en alguna de las condiciones de fermentación, sólo una cepa de *Amycolatopsis* (2001-35-0026A) produjo caldos en los que se detectaron compuestos conocidos presentes en la base de datos. En siete condiciones de fermentación de este cultivo se detectó la presencia de metabolitos conocidos: en 5 caldos se detectó la presencia de rifamicina S, como podría esperarse, mientras que en los otros dos caldos se detectó la presencia de algún polieno y en uno de ellos se detectó además la presencia de coproporfirina III. Sin embargo, es muy llamativo el hecho de que en las otras cepas de *Amycolatopsis* no se hayan detectado estos u otros compuestos conocidos, dada la abundancia de moléculas bioactivas conocidas que produce este género. Estas cepas requieren ser fermentadas a mayor escala, confirmar las actividades observadas y estudiar con mayor detalle las moléculas responsables de las actividades que se están produciendo.

Tabla 27: Resumen de las actividades de las cepas de *Pseudonocardiaceae* ensayadas en las microfermentaciones y en el ensayo con tacos de agar, junto con la detección de ruta(s) biosintética(s) y análisis de LC-MS.

CEPA	ESPECIE MÁS CERCANA	Origen	PKS-I	PKS-II	NRPS	ACTIVIDAD TACO	ACTIVIDAD FERMENTACION	LC-MS
2001-34-0014A	<i>Pseudonocardia alni</i> DSM 44104(T)	ALASKA	SI	SI	SI	NO	NO	SIN COINCIDENCIA
2001-34-0015A	<i>Pseudonocardia alni</i> DSM 44104(T)	ALASKA	SI	SI	SI	NO	NO	SIN COINCIDENCIA
2001-34-0017A	<i>Pseudonocardia alni</i> DSM 44104(T)	ALASKA	ND	ND	ND	NO	<i>S. aureus</i>	No analizado en LC-MS
2001-34-0242A	<i>Pseudonocardia alni</i> DSM 44104(T)	ALASKA	no	no	no	NO	NO	SIN COINCIDENCIA
2001-35-0026A	<i>Amycolatopsis kentuckyensis</i> NRRL B-24129(T)	HAWAI	SI	SI	SI	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	Rifamicina S, Polieno, COPROPORFIRINAI
2001-35-0020A	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> NRRL B-24133(T)	HAWAI	SI	SI	SI	<i>S. aureus</i>	NO	SIN COINCIDENCIA
2001-35-0021A	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> NRRL B-24133(T)	HAWAI	SI	SI	SI	<i>S. aureus</i>	NO	SIN COINCIDENCIA
2001-35-0023A	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> NRRL B-24133(T)	HAWAI	SI	SI	SI	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	SIN COINCIDENCIA
2001-35-0024A	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> NRRL B-24133(T)	HAWAI	SI	SI	SI	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	SIN COINCIDENCIA
2001-35-0025A	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> NRRL B-24133(T)	HAWAI	SI	NO	SI	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	SIN COINCIDENCIA
2001-35-0029A	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> NRRL B-24133(T)	HAWAI	SI	SI	SI	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	SIN COINCIDENCIA
2001-35-0032A	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> NRRL B-24133(T)	HAWAI	SI	SI	SI	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> / <i>A. baumannii</i>	SIN COINCIDENCIA
2001-35-0037A	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> NRRL B-24133(T)	HAWAI	SI	SI	SI	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	SIN COINCIDENCIA
2001-35-0039A	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> NRRL B-24133(T)	HAWAI	SI	NO	SI	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i> / <i>A. baumannii</i>	SIN COINCIDENCIA
2001-35-0046A	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> NRRL B-24133(T)	HAWAI	SI	SI	SI	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	SIN COINCIDENCIA
2001-35-0049A	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> NRRL B-24133(T)	HAWAI	SI	SI	SI	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	SIN COINCIDENCIA
2001-35-0052A	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> NRRL B-24133(T)	HAWAI	SI	NO	SI	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	SIN COINCIDENCIA
2001-35-0054A	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> NRRL B-24133(T)	HAWAI	SI	NO	SI	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	SIN COINCIDENCIA
2001-35-0063A	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> NRRL B-24133(T)	HAWAI	SI	NO	SI	NO	<i>S. aureus</i>	SIN COINCIDENCIA
2001-35-0196A	<i>Pseudonocardia acaciae</i> GMKU095(T)	HAWAI	NO	NO	NO	NO	NO	SIN COINCIDENCIA
2001-35-0119A	<i>Pseudonocardia alaniniphila</i> YIM 16303(T)	HAWAI	NO	NO	NO	NO	NO	SIN COINCIDENCIA
2001-35-0140A	<i>Saccharothrix texasensis</i> NRRL B-16107(T)	HAWAI	SI	SI	NO	NO	NO	SIN COINCIDENCIA
2001-34-0245A	<i>Actinomycetospora chlora</i> TT071-57(T)	REUNION	NO	NO	SI	NO	NO	No analizado en LC-MS
2001-34-0342A	<i>Actinomycetospora lutea</i> TT00-04(T)	REUNION	SI	SI	NO	NO	NO	No analizado en LC-MS
2001-34-0353A	<i>Actinomycetospora lutea</i> TT00-04(T)	REUNION	NO	NO	NO	NO	<i>S. aureus</i>	SIN COINCIDENCIA
2001-34-0068A	<i>Amycolatopsis kentuckyensis</i> NRRL B-24129(T)	REUNION	SI	SI	SI	<i>S. aureus</i> / <i>E. coli</i> / <i>Candida</i>	<i>S. aureus</i> / <i>A. baumannii</i> / <i>C. albicans</i>	SIN COINCIDENCIA
2001-34-0082A	<i>Amycolatopsis kentuckyensis</i> NRRL B-24129(T)	REUNION	SI	NO	NO	<i>S. aureus</i> / <i>E. coli</i> / <i>Candida</i>	<i>S. aureus</i> / <i>A. baumannii</i> / <i>C. albicans</i>	SIN COINCIDENCIA
2001-34-0203A	<i>Amycolatopsis kentuckyensis</i> NRRL B-24129(T)	REUNION	SI	SI	SI	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	SIN COINCIDENCIA
2001-34-0359A	<i>Amycolatopsis kentuckyensis</i> NRRL B-24129(T)	REUNION	SI	NO	SI	NO	<i>S. aureus</i>	SIN COINCIDENCIA
2001-34-0079A	<i>Amycolatopsis lexingtonensis</i> NRRL B-24131(T)	REUNION	SI	NO	SI	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	SIN COINCIDENCIA
2001-34-0266A	<i>Amycolatopsis thermalba</i> SF45(T)	REUNION	NO	NO	SI	NO	NO	SIN COINCIDENCIA
2001-34-0267A	<i>Pseudonocardia</i> sp. (según su morfología)	REUNION	NO	SI	SI	NO	NO	No analizado en LC-MS

4.12.2. Microfermentación de cepas de otras taxonomías: detección de metabolitos mediante LC-MS en los extractos activos.

Además de los cultivos de *Pseudonocardia* fermentados en diversas condiciones y analizados anteriormente, a lo largo del proceso de *screening* interno en el laboratorio, se fermentaron otros 347 cultivos de los estudiados en este trabajo. Estos cultivos dieron lugar a 3412 caldos de fermentación de los cuales 198 fueron activos (5,8%). Estos caldos activos provenían de 59 cultivos diferentes, es decir, el 17% de los cultivos fermentados fueron capaces de producir alguna actividad antimicrobiana en alguna de las condiciones de fermentación. Para tratar de asociar dichas actividades con la producción de algún compuesto conocido, comparamos los perfiles de metabolitos de los caldos de fermentación obtenidos mediante el análisis de LC-MS con los perfiles de metabolitos presentes en la base de datos.

De los 59 cultivos activos, 38 se analizaron mediante LC-MS y de estos, 19 produjeron en alguno de sus caldos de fermentación algún compuesto conocido, mientras que para los otros 19 cultivos analizados no se llegó a identificar ningún compuesto conocido, con lo que habría que estudiar en más profundidad el(los) metabolito(s) responsable de la actividad antimicrobiana detectada. En la [Tabla 28](#) se listan los cultivos que presentan algún caldo activo junto con las actividades detectadas, tanto inicialmente en el taco como en la posterior fermentación así como el (los) compuesto(s) detectados en los respectivos caldos. De las 59 cepas que fueron activas en el *screening*, 24 de ellas no fueron activas cuando inicialmente se ensayó su capacidad para producir actividades antimicrobianas mediante tacos de agar. Otras 11 cepas fueron activas pero no se ensayaron anteriormente como tacos de agar. Las 24 cepas activas restantes sí fueron activas cuando se ensayaron sus tacos de agar. Prácticamente todas ellas, 23 de las 24, repitieron su actividad inicial total o parcialmente, ya que en algunos casos, cultivos que fueron activos frente a más de una cepa diana no repitieron todas y cada una de las actividades cuando se fermentaron. Sólo hubo una cepa que no repitió su actividad inicial ya que el taco de agar fue activo contra *S. aureus* y la fermentación fue activa contra *Candida*. Nueve de las cepas sí repitieron exactamente igual la actividad del taco y la de la fermentación. De las 14 cepas restantes, 2 fueron activas frente a más cepas diana en la fermentación que en el taco. Sin embargo, en las otras 12 cepas activas, fueron los tacos los que mayor número de actividades presentaron, no repitiéndose algunas de ellas cuando los cultivos se fermentaron.

Tabla 28: Cultivos que presentan algún caldo activo junto con las actividades detectadas, tanto inicialmente en el taco como en la posterior fermentación así como el (los) compuesto(s) detectados por LC/MS y la detección de rutas biosintéticas PKS-I, PKS-II y NRPS. (ND: sin dato)

CEPA	ESPECIE MÁS CERCANA	Origen	PKS-I	PKS-II	NRPS	ACTIVIDAD TACO	ACTIVIDAD FERMENTACION	LC-MS
2001-34-0012A	<i>Streptomyces atrovirens</i> NRRL B-16357	ALASKA	NO	NO	NO	no ensayado	S. aureus / Candida	Mesilato de deferoxamina, Norcardamina
2001-34-0013A	<i>Streptomyces pactum</i> NBRC 13433	ALASKA	SI	SI	NO	NO	S. aureus	Loboforina A, Loboforina B
2001-34-0010A	<i>Streptomyces recifensis</i> NBRC 12813	ALASKA	NO	SI	SI	no ensayado	S. aureus	Des-HOAC-Griseoluteína B
2001-34-0011A	<i>Streptomyces recifensis</i> NBRC 12813	ALASKA	NO	SI	SI	no ensayado	S. aureus	
2001-35-0035A	<i>Actinomadura</i>	HAWAI	SI	SI	NO	S. aureus / E. coli / Candida	S. aureus / E. coli	SIN COINCIDENCIA
2001-35-0221A	<i>Actinomadura</i>	HAWAI	NO	NO	NO	NO	S. aureus	
2001-35-0150A	<i>Amycolatopsis saalfeldensis</i> HKI0457	HAWAI	ND	ND	ND	NO	S. aureus	
2001-35-0012A	<i>Micromonospora</i>	HAWAI	NO	NO	SI	NO	S. aureus / E. coli	SIN COINCIDENCIA
2001-35-0168A	<i>Micromonospora</i>	HAWAI	SI	SI	SI	NO	S. aureus	
2001-35-0230A	<i>Micromonospora</i>	HAWAI	NO	NO	NO	NO	S. aureus	
2001-35-0072A	<i>Micromonospora chokoriensis</i> 2-19/6	HAWAI	SI	SI	NO	NO	E. coli	SIN COINCIDENCIA
2001-35-0218A	<i>Micromonospora chokoriensis</i> 2-19/6	HAWAI	SI	SI	SI	NO	S. aureus	
2001-35-0011A	<i>Pseudonocardia</i>	HAWAI	ND	ND	ND	S. aureus	S. aureus / E. coli	Actinomicina D, Actinomicina C2
2001-35-0019A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	ND	ND	ND	no ensayado	Candida	
2001-35-0060A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	ND	ND	ND	NO	S. aureus / E. coli	SIN COINCIDENCIA
2001-35-0074A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	SI	NO	NO	S. aureus / Candida	S. aureus / Candida	Nigericina
2001-35-0118A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	ND	ND	ND	S. aureus / E. coli / Candida	S. aureus	
2001-35-0169A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	ND	ND	ND	no ensayado	Candida	
2001-35-0244A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	ND	ND	ND	no ensayado	Candida	
2001-35-0014A	<i>Streptomyces arenae</i> NBRC 13016	HAWAI	NO	SI	SI	S. aureus / Candida	S. aureus / Candida	Coproporfirina III (L-000679962-002J001)
2001-35-0087A	<i>Streptomyces bambergiensis</i> NBRC 13479	HAWAI	SI	SI	NO	S. aureus / E. coli / Candida	S. aureus	SIN COINCIDENCIA
2001-35-0110A	<i>Streptomyces caniferus</i> NBRC 15389	HAWAI	SI	SI	NO	S. aureus / Candida	S. aureus	Platensina y Platensimicina
2001-35-0185A	<i>Streptomyces drozdowiczii</i> NBRC 101007	HAWAI	SI	NO	SI	NO	Candida	SIN COINCIDENCIA
2001-35-0136A	<i>Streptomyces longwoodensis</i> LMG 20096	HAWAI	SI	SI	NO	S. aureus / Candida	Candida	SIN COINCIDENCIA
2001-35-0129A	<i>Streptomyces murinus</i> NBRC 12799	HAWAI	SI	NO	NO	S. aureus / E. coli / Candida	Candida	SIN COINCIDENCIA
2001-35-0117A	<i>Streptomyces netropsis</i> NBRC 3723	HAWAI	SI	SI	NO	Candida	Candida	polieno_N=5, Aureotina
2001-35-0145A	<i>Streptomyces niveoruber</i> NBRC 15428	HAWAI	NO	NO	NO	S. aureus / E. coli	S. aureus	Viridogriseína, Griseoviridina
2001-35-0183A	<i>Streptomyces niveus</i> NRRL 2466	HAWAI	NO	NO	NO	S. aureus / E. coli	S. aureus / E. coli	Novobiocina
2001-35-0086A	<i>Streptomyces nogalater</i> JCM 4799	HAWAI	SI	NO	SI	S. aureus / E. coli	S. aureus	
2001-35-0001A	<i>Streptomyces tendae</i> ATCC 19812	HAWAI	SI	SI	SI	S. aureus	S. aureus	
2001-35-0006A	<i>Streptomyces tendae</i> ATCC 19812	HAWAI	NO	NO	NO	NO	S. aureus	
2001-35-0092A	<i>Streptomyces thinghirensis</i> DSM 41919	HAWAI	NO	SI	SI	no ensayado	S. aureus	
2001-35-0095A	<i>Streptomyces xanthochromogenes</i> NRRL B-5410	HAWAI	NO	SI	NO	S. aureus / E. coli	S. aureus	Cloranfenicol, Coproporfirina III
2001-34-0028A	<i>Actinoplanes digitatis</i> IFO 12512	REUNION	SI	NO	NO	S. aureus	S. aureus / E. coli	SIN COINCIDENCIA

CEPA	ESPECIE MÁS CERCANA	Origen	PKS-I	PKS-II	NRPS	ACTIVIDAD TACO	ACTIVIDAD FERMENTACION	LC-MS
2001-34-0295A	indeterminado	REUNION	SI	SI	SI	no ensayado	S. aureus	
2001-34-0360A	indeterminado	REUNION	SI	NO	NO	S. aureus / Candida	S. aureus / Candida	SIN COINCIDENCIA
2001-34-0290A	<i>Micromonospora</i>	REUNION	NO	NO	SI	NO	S. aureus	SIN COINCIDENCIA
2001-34-0300A	<i>Micromonospora</i>	REUNION	SI	SI	SI	NO	S. aureus	SIN COINCIDENCIA
2001-34-0303A	<i>Micromonospora</i>	REUNION	NO	NO	NO	NO	S. aureus	SIN COINCIDENCIA
2001-34-0336A	<i>Micromonospora</i>	REUNION	SI	SI	SI	NO	S. aureus	
2001-34-0346A	<i>Micromonospora</i>	REUNION	SI	SI	SI	NO	S. aureus	SIN COINCIDENCIA
2001-34-0331A	<i>Micromonospora aurantiaca</i> ATCC 27029	REUNION	SI	SI	SI	S. aureus	S. aureus	
2001-34-0333A	<i>Micromonospora aurantiaca</i> ATCC 27029	REUNION	SI	SI	SI	S. aureus / E. coli	S. aureus	SIN COINCIDENCIA
2001-34-0335A	<i>Micromonospora humi</i> P0402	REUNION	SI	NO	SI	NO	S. aureus	Nocardamina
2001-34-0044A	<i>Streptomyces</i>	REUNION	NO	SI	NO	NO	S. aureus / E. coli	Mitramicina A, Nocardamina, Des-HOAC-Griseoluteína B
2001-34-0195A	<i>Streptomyces</i>	REUNION	SI	SI	NO	NO	S. aureus	
2001-34-0280A	<i>Streptomyces</i>	REUNION	SI	SI	SI	NO	S. aureus	SIN COINCIDENCIA
2001-34-0294A	<i>Streptomyces</i>	REUNION	ND	ND	ND	Candida	Candida	SIN COINCIDENCIA
2001-34-0301A	<i>Streptomyces</i>	REUNION	ND	ND	ND	no ensayado	S. aureus / E. coli	SIN COINCIDENCIA
2001-34-0320A	<i>Streptomyces</i>	REUNION	ND	ND	ND	S. aureus	Candida	SIN COINCIDENCIA
2001-34-0362A	<i>Streptomyces</i>	REUNION	ND	ND	ND	no ensayado	S. aureus	
2001-34-0087A	<i>Streptomyces cirratus</i> NBRC B-3250	REUNION	SI	SI	NO	S. aureus / Candida	S. aureus	
2001-34-0153A	<i>Streptomyces libani</i> subsp. <i>rufus</i> LMG 20087	REUNION	NO	SI	NO	S. aureus / Candida	Candida	Tricostatina A, Tricostatina C or D, ácido tricostático
2001-34-0158A	<i>Streptomyces lydicus</i> NBRC 13058	REUNION	SI	SI	SI	Candida	Candida	Nocardamina
2001-34-0067A	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> NBRC 3178	REUNION	SI	NO	NO	NO	S. aureus	Nocardamina
2001-34-0141A	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> NBRC 3178	REUNION	SI	SI	NO	NO	S. aureus	Nocardamina
2001-34-0217A	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> NBRC 3178	REUNION	SI	SI	SI	NO	S. aureus	Nocardamina
2001-34-0302A	<i>Streptomyces purpurascens</i> NBRC 13077	REUNION	NO	SI	SI	NO	S. aureus	
2001-34-0104A	<i>Streptomyces seoulensis</i> NBRC 16668	REUNION	NO	SI	NO	no ensayado	S. aureus / E. coli	Mitramicina A, Des-HOAC-Griseoluteína B

Discusión

5. DISCUSIÓN

5.1. Diversidad de las cepas aisladas de líquenes.

Como planteábamos en los objetivos, el trabajo realizado se ha basado en la hipótesis de que microhábitats poco explorados, como son los líquenes, probablemente contienen nuevos actinomicetos cuya diversidad metabólica derive en la capacidad de producir nuevos metabolitos bioactivos.

En concreto, en este trabajo nos hemos enfocado en el estudio de los actinomicetos filamentosos cultivables que habitan en líquenes recogidos en diversas localizaciones geográficas distantes, y con características ecológicas diferentes, con el objetivo de explotar estos recursos para la obtención de nuevos productos naturales con aplicación biotecnológica.

5.1.1. Evaluación de la diversidad de las cepas según el origen de los líquenes e influencia de los métodos de aislamiento.

El líquen puede considerarse como un microcosmos que representa un hábitat único y estructurado con una complejidad ecológica y una diversidad bacteriana mucho mayor de lo que se pensaba anteriormente ([Hodkinson et al., 2012](#)). Aunque el conocimiento sobre la composición filogenética y la variabilidad de las comunidades microbianas que habitan los líquenes es todavía muy limitado, los estudios llevados a cabo hasta la fecha parecen indicar que todas estas comunidades están dominadas por *Alphaproteobacteria* y que cada especie de líquen alberga una comunidad microbiana distinta, muy bien estructurada ([Cardinale et al., 2008](#); [Printzen et al., 2012](#)).

Nuestro estudio ha planteado la utilización de fuentes alternativas para el aislamiento de nuevas cepas de actinomicetos combinado con el acceso a muestras de diferentes puntos geográficos para estudiar las diferentes poblaciones de actinomicetos que pueden recuperarse de distintos sitios de muestreo. Esta hipótesis de trabajo se basa en los estudios de ecología microbiana que plantean si los microorganismos son cosmopolitas o si puede encontrarse algún grado de endemismo resultante y mantenido por el aislamiento geográfico o bien por una serie de factores bióticos y abióticos ([Torsvik et al., 1996](#); [Buckley y Schmidt, 2002](#); [Torsvik et al., 2002](#); [Fierer y Jackson, 2006](#); [Van der Gucht et al., 2007](#)). La hipótesis tradicional entre los microbiólogos ha sido el postulado formulado por Beijerinck-Bass-Becking ([Beijerinck, 1913](#); [Baas-Becking, 1934](#)): “todo está en todas partes, el medioambiente selecciona”. Sin embargo, diversos estudios de ecología microbiana han demostrado que algunos taxones pueden exhibir unos marcados patrones biogeográficos como consecuencia del aislamiento geográfico y/o la influencia de diversos factores medioambientales locales que son determinantes y clave en la composición de las comunidades microbianas ([Whitaker et al., 2003](#); [Martiny et al., 2006](#); [Van der Gucht et al., 2007](#); [Wawrik et al., 2007](#); [Edlund et al., 2011](#)). Fierer y Jackson (2006) analizaron la diversidad microbiana y la biogeografía de las comunidades microbianas del suelo, estudiando los factores medioambientales que influyen en su biodiversidad. Estos autores concluyeron que la diversidad bacteriana no estaba

relacionada con la temperatura del lugar, la latitud ni con otras variables que habitualmente predicen la diversidad de plantas y animales y que era además muy independiente de la distancia geográfica. Sin embargo, la diversidad y riqueza de las comunidades de bacterias del suelo sí que diferían según el tipo de ecosistema y estas diferencias podrían explicarse en gran parte por el pH del suelo. Así pues, los factores medioambientales frecuentemente citados como buenos indicadores de la diversidad de animales y plantas a escala continental tienen poco efecto en la medida de diversidad de las bacterias del suelo.

Conclusiones similares se han obtenido en diversos estudios sobre la diversidad de las comunidades microbianas que habitan los líquenes que indican que se ve afectada por diversos factores bióticos y abióticos, entre los que se incluyen no sólo la posición filogenética del líquen con los dos tipos de fotobiontes posibles y el micobionte, sino también diferencias geográficas a gran escala y diferencias climáticas (Grube y Berg, 2009; Selbmann *et al.*, 2010), el sustrato donde crece el líquen (roca, árbol, sotobosque) (Cardinale *et al.*, 2012a), las condiciones del microhábitat, así como el patrón de metabolitos secundarios producidos tanto por el hongo como por los integrantes de la comunidad bacteriana (Cardinale *et al.*, 2006; Cardinale *et al.*, 2008; Grube y Berg, 2009).

Los resultados obtenidos en este trabajo han confirmado que a pesar de la relativamente escasa abundancia de actinobacterias, los líquenes pueden ser un nicho ecológico interesante y una fuente alternativa para el aislamiento de cepas de actinomicetos, si bien hay que resaltar que aunque hemos podido aislar una gran diversidad de actinomicetos a partir de estas fuentes, hemos observado grandes diferencias según la localización geográfica y el entorno ecológico, tanto en cuanto al número total de cepas aisladas como al número de grupos taxonómicos obtenidos entre los líquenes de zonas frías y de zonas tropicales, siendo muy superior la abundancia de cepas y la diversidad de taxones entre las poblaciones aisladas de líquenes tropicales. Sin embargo, a pesar de estas diferencias hay que destacar que algunos taxones sólo pudieron aislarse de líquenes de Alaska, como es el caso de las únicas cepas de *Gordonia* sp. que se aislaron de todas las muestras de líquenes ensayadas o varias cepas del género *Pseudonocardia* sp.

Hodkinson y colaboradores (2012), estudiaron las comunidades microbianas asociadas con líquenes de Alaska y de Costa Rica conteniendo los líquenes de Alaska mayoritariamente un alga verde como fotobionte mientras que los de Costa Rica contenían fundamentalmente cianobacterias. La presencia de un tipo u otro de fotobionte determina en gran medida la composición de la comunidad bacteriana, siendo las α -proteobacterias el grupo que predomina (más del 60% de la población) en los líquenes que tienen algas verdes como fotobiontes. En cualquier caso, las cepas de la clase "*Actinobacteria*" que describen, pertenecen a la familia *Micrococcineae* y en ningún caso describen la presencia de alguna actinobacteria filamentosa. En nuestro caso, de los líquenes recolectados en Alaska hemos podido aislar también un número muy reducido de actinobacterias, en comparación con el elevado número de actinomicetos cultivables obtenidos de líquenes de Hawai y Reunión.

En cuanto a los líquenes recolectados en Hawai y Reunión, vemos que tienen en común la latitud por su proximidad a los trópicos pero sin embargo los ecosistemas y entornos ecológicos de donde se recolectaron son muy diferentes, procediendo los de

Hawai de zonas volcánicas semiáridas, mientras que los de Reunión procedían de bosques húmedos tropicales. Estos entornos, además del propio microhábitat del líquen, hacen que los factores medioambientales sean totalmente diferentes en ambos casos y que por tanto podría esperarse que distintas poblaciones de actinomicetos se recuperaran de estos líquenes. Este es el caso de las cepas de la familia *Thermomonosporaceae* que se aislaron únicamente de líquenes de Hawai mientras que dos cepas del género *Streptosporangium* y una de *Planobispora* sp. se aislaron de Reunión.

Por otro lado, entre los líquenes de Hawai nos encontramos con otro factor que podría influir en la diversidad de las poblaciones aisladas como es el hecho de tener líquenes arbóreos y saxícolas, no sólo por la diferencia taxonómica del propio líquen sino también por otros factores medioambientales derivados de esta característica. Así pues, no es de extrañar que se observaran algunas diferencias entre ambos tipos de líquenes, tanto en el número total de cepas aisladas como en el aislamiento diferencial de algunos grupos taxonómicos, siendo mayor el número relativo de cepas aisladas de líquenes arbóreos que de líquenes de rocas. Además, algunas cepas se aislaron exclusivamente de líquenes arbóreos, como es el caso de numerosas cepas pertenecientes a la familia *Pseudonocardiaceae*, asignadas al género *Amycolatopsis*, una cepa de *Saccharotrix* sp., una *Nocardia* sp., un *Geodermatophilus* sp., así como un mayor número de especies de *Streptomyces*, mientras que una cepa de *Pseudonocardia* sp. y tres de *Actinoplanes* sp. se aislaron únicamente de líquenes de roca. En este punto cabe señalar que las otras especies aisladas de *Pseudonocardia* se obtuvieron también de líquenes saxícolas de Alaska. Como acabamos de comentar, las cepas de *Streptomyces* de Hawai se obtuvieron en mayor número de los líquenes de árboles (43,6%) que de los saxícolas (33,3%) siendo las cepas de *Micromonospora* más abundantes en los líquenes saxícolas (43,6%) que en los líquenes arbóreos (28,7%).

Por último, decir que las cepas del género *Streptomyces* fueron las más abundantes, pero en términos relativos respecto a cada origen, se aislaron en porcentajes similares tanto de zonas frías como de zonas tropicales, representando el 38,5% de las cepas de Alaska, mientras que el porcentaje de las mismas fue del 38,9% y del 39,3% de líquenes de Hawai y Reunión respectivamente. Sin embargo, no ocurre lo mismo con las cepas de la familia *Micromonosporaceae*, donde el porcentaje de cepas aisladas de Alaska fue menor (23,1%) en comparación con las zonas tropicales, en donde los porcentajes de cepas aisladas de Hawai y de Reunión fueron del 35,5% y el 38,3%.

La utilización combinada de métodos de aislamiento generales y específicos permite aumentar la diversidad microbiana de una muestra, favoreciendo tanto el aislamiento de especies de crecimiento rápido como el género *Streptomyces*, como el crecimiento de otros taxones minoritarios de lento crecimiento. El uso de concentraciones subinhibitorias de varios antibióticos permite inhibir selectivamente el crecimiento de otro tipo de bacterias competidoras aumentando el número de actinomicetos de crecimiento lento, como se observa con la utilización de novobiocina, que disminuye el número de cepas de *Streptomyces* aisladas, no viéndose afectadas las cepas del género *Micromonospora*.

Los métodos de aislamiento empleados permitieron el aislamiento diferencial de distintos grupos taxonómicos. Un alto porcentaje de las cepas de *Streptomyces* (56%) se obtuvieron con el método menos específico y menos restrictivo como es la dilución seriada, mientras que un gran porcentaje de cepas de la familia *Pseudonocardiaceae* (68,7%) y del

género *Actinomadura* (80%) se aislaron con un método algo más selectivo como es el tratamiento con calor. Sin embargo, una gran proporción de las cepas del género *Micromonospora* se aislaron mediante el tratamiento con BC (40,7%), aunque también se aislaron representantes de este género con el método de dilución y el tratamiento con calor. Por último, con respecto a la influencia de la adición de novobiocina a los medios de aislamiento en vez de ácido nalidíxico, de uso más frecuente para el aislamiento de actinomicetos, parece que reduce el número total de cepas aisladas (un 30,2% en medios con novobiocina frente a un 69,8% en los medios con ácido nalidíxico). Sin embargo, las cepas de *Actinoplanes* aisladas sólo se obtuvieron de medios suplementados con novobiocina, mientras que las de *Micromonospora* se aislaron por igual de medios con cualquiera de los antibióticos. Por el contrario, las cepas de *Streptomyces* se aislaron prácticamente en su totalidad (93%) de medios con ácido nalidíxico.

Como hemos visto, las diferencias encontradas en las poblaciones de microorganismos aislados de distintas localizaciones podrían explicarse por los distintos factores medioambientales de cada entorno geográfico así como por los distintos líquenes recolectados de cada origen, más que ser resultado de la localización geográfica de los mismos. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por otros autores ([Cardinale et al., 2006](#); [Grube y Berg, 2009](#); [Bates et al., 2011](#); [Cardinale et al., 2012b](#); [Hodkinson et al., 2012](#); [Printzen et al., 2012](#)), ya que las bacterias que habitan los líquenes parece que están estructuradas según un patrón geográfico-climático. Este patrón geográfico se encuentra muy a menudo en bacterias en sistemas simbióticos, ya que estas bacterias requieren un entorno muy específico y no serán capaces de dispersarse ([Taylor et al., 2005](#); [Najar-Rodríguez et al., 2009](#); [Russell et al., 2009](#)). Este es el caso de muchos grupos de bacterias asociadas a líquenes que pueden estar asociadas obligatoriamente con sus líquenes, estando en consecuencia, limitada su capacidad de dispersión. Este hecho, sin embargo, no impide que algunos taxones sean cosmopolitas y puedan estar presentes en cualquier localización ([Van der Gucht et al., 2007](#))

5.1.2. Evaluación de la diversidad según la composición de ácidos grasos.

En este trabajo, hemos llevado acabo una aproximación metodológica múltiple o polifásica haciendo uso tanto de marcadores quimiotaxonómicos como de herramientas moleculares con distintos niveles de resolución taxonómica con el fin de evaluar la diversidad de las comunidades microbianas aisladas de líquenes.

La composición en ácidos grasos de bacterias es una de las aproximaciones más útiles para su clasificación e identificación. Los ácidos grasos han demostrado su utilidad en sistemática bacteriana y han sido ampliamente estudiados dado que, en condiciones estandarizadas, proporcionan parámetros comparables entre cepas, presentando un patrón similar los organismos de especies relacionadas. La diversidad química de los ácidos grasos (longitud de cadena, presencia y posición de insaturaciones y de grupos sustituyentes) junto con la estabilidad y reproducibilidad en la composición de los ácidos grasos presentes en una bacteria ha hecho que sean considerados como marcadores quimiotaxonómicos de gran utilidad en la caracterización de los distintos grupos taxonómicos bacterianos ([Abel et al., 1963](#); [Lechevalier y Lechevalier, 1970](#); [Drucker y Norris, 1976](#); [Lechevalier, 1977](#); [Kroppenstedt y Kutzner, 1976](#); [Goodfellow y Minnikin,](#)

1985; Kroppenstedt, 1985; Vasyurenko y Frolov, 1986; Kaneda, 1991). El análisis de FAMES ha demostrado ser una técnica rápida y sensible, y es reproducible cuando las condiciones experimentales están estandarizadas (Sasser *et al.*, 1984; Stead *et al.*, 1992) habiéndose utilizado en numerosos trabajos bien para estudiar la diversidad de cepas aisladas de diversos entornos o para identificar y clasificar diversos grupos de bacterias (Vauterin *et al.*, 1992, 1996; Muller *et al.*, 1998; Heyrman *et al.*, 1999; Caudales *et al.*, 2000; Glucksman *et al.*, 2000; Tighe *et al.*, 2000; Mergaert *et al.*, 2001). Sin embargo, cabe resaltar que hasta la fecha y hasta donde alcanza nuestro conocimiento, el trabajo aquí presentado es el primero en el que se aplica el análisis de ácidos grasos para estudiar la diversidad de los actinomicetos cultivables que habitan en los líquenes y además, aplicado a diversos grupos taxonómicos de actinomicetos. El análisis de ácidos grasos sí se ha utilizado anteriormente en otros estudios para evaluar la diversidad de actinomicetos pero aplicado sólo a grupos concretos, principalmente del género *Streptomyces*, bien para estudios taxonómicos (Kämpfer y Kroppenstedt, 1991) o bien para estudios ambientales (Ndwora *et al.*, 1996; Bowers *et al.*, 1996), pero en ningún caso extendido a tantos taxones de actinomicetos.

Aunque el análisis del perfil de los ácidos grasos ha podido aplicarse sólo al 68,6% de los cultivos objeto de este trabajo, ha permitido alcanzar un doble objetivo. Por un lado, ha servido no sólo para confirmar la gran mayoría de las asignaciones de géneros inicialmente hechas en base a la morfología de las cepas aisladas sino también para ubicar en taxones específicos algunos cultivos que por su morfología no pudieron ser asignados a ningún taxón ya que no fueron capaces de diferenciarse en las condiciones de cultivo utilizadas, así como para asignar de forma correcta algunos cultivos que habían sido inicialmente identificados erróneamente. Este es el caso de 21 cultivos estériles no asignados a ningún taxón que pudieron posicionarse en diversos *clusters* que agrupaban cultivos con taxonomías conocidas, asignándose tentativamente estas cepas a miembros de los géneros *Micromonospora*, *Amycolatopsis*, *Streptomyces* y *Nocardia*. En cada uno de los casos la composición de los ácidos grasos característicos de estas cepas está en correlación con los definidos para estos taxones, corroborando su posición taxonómica y confirmada luego por secuenciación del gen ribosomal 16S.

Por otro lado, el análisis de *clusters* basado en los perfiles de ácidos grasos ha permitido además una rápida evaluación de la diversidad de la comunidad microbiana estudiada. Este método se aplicó como una herramienta válida complementaria para verificar las relaciones entre las cepas dentro de los grupos mayoritarios de cultivos como se ha hecho en otros estudios anteriormente (Fischer *et al.*, 1983; Schaal, 1985; Morón *et al.*, 1999; Salazar *et al.*, 2002). Esta técnica ha permitido la identificación de un grupo de cepas, aisladas de zonas tropicales, morfológicamente relacionadas con la familia *Pseudonocardiaceae* que tras un análisis más detallado de su composición en ácidos grasos fueron asignadas al género *Amycolatopsis*. Este grupo de cepas de la familia *Pseudonocardiaceae* (*cluster* 4), se separaba claramente de otro grupo de cepas de dicha familia (*cluster* 7), que presentaban ácidos grasos característicos del género *Pseudonocardia* y que fueron aislados de líquenes de Alaska (Figura 7). De nuevo, la composición en ácidos grasos nos ha permitido distinguir las dos poblaciones de miembros de la familia *Pseudonocardiaceae* aisladas de líquenes de distinto procedencia.

Hay que destacar que el análisis de ácidos grasos es una técnica ampliamente utilizada para describir la diversidad de poblaciones de *Streptomyces* dada la buena discriminación que ofrece para distinguir entre cepas estrechamente relacionadas de este género (Kämpfer y Kroppenstedt, 1991; Ndowora *et al.*, 1996, Bowers *et al.*, 1996; Anderson y Wellington, 2001). Sin embargo, para otros grupos de actinomicetos, como es el caso de la familia *Micromonosporaceae*, presenta más limitaciones y no es una técnica tan utilizada dado que una gran proporción de cepas no crecen adecuadamente en el medio de crecimiento estándar utilizado para el cultivo de los microorganismos, paso previo a la obtención del micelio para su extracción. En cualquier caso y a pesar de este inconveniente, es una técnica que, aunque aplicada a un reducido número de cultivos, nos ha permitido también distinguir claramente dos poblaciones diferenciadas de cepas de *Micromonospora*, provenientes respectivamente de Hawai (*cluster* 1) y de líquenes de Reunión (*cluster* 2).

En cuanto a los ácidos grasos diagnóstico, característicos de cada grupo taxonómico, vemos que las cepas se reparten en el dendrograma de acuerdo a la clasificación establecida por Kroppenstedt. Las cepas de las familias *Micromonosporaceae*, *Pseudonocardiaceae* (género *Amycolatopsis*), *Streptosporangiaceae* y *Thermomonosporaceae* tienen ácidos grasos tipo 3 (3b, 3b, 3f y 3a, respectivamente) y se agrupan en los *clusters* 1, 2, 4 y 5. La única excepción que hemos encontrado a este agrupamiento de las cepas en los distintos *clusters* según el tipo de patrón de ácidos grasos es una cepa de *Pseudosporangium* sp. perteneciente al tipo 2d que forma el *cluster* 3 en medio de los anteriores. Las cepas del género *Streptomyces* y las del género *Pseudonocardia*, tienen ácidos grasos de tipo 2 (2c y 2d) y se agrupan en los *clusters* 6 y 7, respectivamente. Por último, las cepas de la familia *Gordoniaceae* y *Nocardiaceae* son del tipo 1b y se integran en el *cluster* 8.

Un estudio más detallado del análisis de *clusters* de FAMES, con las ramas del dendrograma sin colapsar (Anexo 4), nos permite ver que esta técnica no solamente es capaz de agrupar los microorganismos a niveles taxonómicos altos, como familia y género sino que también tiene mayor capacidad de resolución permitiendo distinguir entre cepas muy relacionadas. De esta forma, los ocho grandes *clusters* descritos anteriormente se subdividen a su vez en 49 *clusters* distintos cuando fijamos un punto de corte más alto, del 99% de similitud, permitiéndonos establecer relaciones de similitud entre las cepas de forma más precisa. En general, pudimos ver que las cepas asignadas a la misma especie, según la identificación resultante de la secuencia del gen 16S ARNr, se agrupaban dentro del mismo *cluster* o en *clusters* próximos y que cepas asignadas a distintas especies se separaban en distintos *clusters*. Además, este análisis detallado, permite ver no sólo que algunas cepas son minoritarias, como la única cepa de *Pseudosporangium* sp. (*cluster* 3) o los *clusters* menores de *Streptomyces* (6-b, 6-d, 6-e y 6-f con 7, 6, 2 y 3 cepas, respectivamente) sino que permite detectar la presencia de cepas únicas que contienen ácidos grasos poco frecuentes, como las 11 cepas de *Streptomyces* que contienen ácidos grasos hidroxilados, 8 de ellas con el ácido graso 17:0 *iso* 2OH, 2 con 18:1 2OH y una con ambos ácidos grasos; o las 3 cepas de *Streptomyces* que contienen el ácido graso 10-metil 18:0 (tuberculoesteárico).

Por último señalar que el análisis de *clusters* basado en la composición de ácidos grasos nos ha permitido reconocer las distintas poblaciones de cepas de la familia *Micromonosporaceae* y del género *Streptomyces* que se pueden aislar según la

localización geográfica de los líquenes de los que proceden, puesto que gran parte de las cepas de *Micromonospora* aisladas de líquenes de Hawai se agrupan en el *cluster* 1, mientras que la mayoría de las de Reunión se encuentran en el *cluster* 2; o las cepas de *Streptomyces* aisladas de Hawai que se agrupan mayoritariamente en el *cluster* 6-a (el 63,9% de las cepas de este *cluster* provienen de líquenes de Hawai) mientras las cepas de *Streptomyces* aisladas de Reunión se localizan mayoritariamente en el *cluster* 6-c (72,4% de las cepas de este *cluster* provienen de líquenes de Reunión). Estos datos demuestran que algunas especies concretas de *Micromonospora* y de *Streptomyces* sólo pueden recuperarse de determinados lugares, presentando unos patrones biogeográficos, como ya han demostrado otros autores (Wawrik *et al.*, 2007; Van der Gucht *et al.*, 2007; Edlund *et al.*, 2011).

Por tanto, el análisis de la composición de ácidos grasos nos permite resolver y agrupar las cepas a distintos niveles taxonómicos, con mayor o menor grado de resolución según el porcentaje de similitud que establezcamos como punto de corte para definir las OTUs. Además, un estudio detallado de los ácidos grasos diagnóstico permite asignar los cultivos a diversos géneros mientras que el análisis de *clusters* nos permite simultáneamente estudiar la diversidad de las cepas con un alto nivel de discriminación.

Por otra parte, vemos que el análisis de FAMES puede usarse satisfactoriamente para estudiar la diversidad de las comunidades microbianas presentes en líquenes recolectados en diversas localizaciones geográficas. Ciertos parámetros del ecosistema como son factores climáticos, físicos, químicos y biológicos, incluyendo entre estos el microhábitat generado por el propio líquen y las interacciones entre estos y la población microbiana que los habita parece que determinan la composición de las poblaciones recuperadas de los líquenes.

5.1.3. Análisis de las secuencias del gen ribosomal 16S rADN.

Siguiendo la aproximación polifásica establecida, analizamos la secuencia parcial del gen 16S ARNr de 222 de las 404 cepas estudiadas (55%). La secuencia del gen 16S ARNr es una herramienta imprescindible para establecer un posicionamiento filogenético de las cepas así como para una identificación más precisa de los cultivos aportando información complementaria a la obtenida con otras técnicas como FAMES, donde las cepas analizadas se agruparon en grandes *clusters* según la familia o género al que pertenecían, incluyendo las cepas no identificadas, mostrándonos las diversas poblaciones de actinomicetos aislados de distintos ecosistemas y localizaciones.

Numerosos autores y grupos de investigación han estudiado la diversidad de diferentes grupos taxonómicos, entre los que se incluyen los actinomicetos, comparando los resultados obtenidos con distintas técnicas fenotípicas y genotípicas con los resultados de la secuenciación, tratando de establecer una posible correlación entre las técnicas utilizadas y viendo a qué nivel discriminan y aportan información cada una de ellas. En este sentido se ha visto que existe una estrecha correlación en la relación entre cepas definida en base a las secuencias de la región 16S y las establecidas por el análisis de ácidos grasos (Fischer *et al.*, 1983; Guckert *et al.*, 1991; Vauterin *et al.*, 1992; Yang *et al.*, 1993a; Kohring *et al.*, 1994; Roberts *et al.*, 1998; Tonjum *et al.*, 1998; Torkko *et al.*, 1998; Tighe *et al.*, 1998).

al., 2000), así como con diversas técnicas de *fingerprinting* (Goodfellow, 1995; Sadowsky *et al.*, 1996; Foti *et al.*, 2006; Davelos *et al.*, 2004a; Davelos *et al.*, 2004b; Davelos *et al.*, 2004c; Lanoot *et al.*, 2004; Lanoot *et al.*, 2005; Baines *et al.*, 2007). También hay que tener en cuenta que aunque la secuencia del gen 16S ARNr es útil para comparar distintos microorganismos a distintos niveles taxonómicos, desde el nivel de especie hasta el de reino, no es capaz de diferenciar, en muchos casos, entre especies estrechamente relacionadas (Stackebrandt y Goebel, 1994).

La información obtenida con la secuencia ribosomal no sólo confirmó en todos los casos la asignación a un género establecida anteriormente con el análisis de ácidos grasos sino que también permitió posicionar en numerosas especies las cepas analizadas con FAMEs, incluyendo también los 21 cultivos estériles (9,5% de los cultivos secuenciados) no asignados a ningún taxón y distribuidos en diversos *clusters* con cultivos con taxonomías conocidas según su composición de ácidos grasos. Además de estas cepas, el análisis de la secuencia ha permitido identificar o reclasificar hasta 40 cultivos (18% de los secuenciados) que corresponden mayoritariamente a la familia *Pseudonocardiaceae* (26 cultivos) de los géneros *Amycolatopsis* (19 cepas), *Pseudonocardia* (5 cepas), *Actinomyces* (3 cepas), así como una cepa de *Saccharotrix* sp., pero también otros cultivos reasignados a otros géneros como *Streptomyces* (4 cepas), *Actinoplanes* (3 cepas), *Gordonia* (3 cepas) y *Actinomyces*, *Streptosporangium* y *Nocardia* (cada uno con una cepa). El uso combinado del análisis de FAMEs y de las secuencias ribosomales ha permitido posicionar un total de 61 cepas (21,2% de las cepas analizadas con FAMEs y/o secuenciadas) erróneamente clasificadas debido a que eran indistinguibles según su morfología de otras cepas pertenecientes a otros géneros. En todos estos casos descritos vemos que la secuenciación confirma y asigna correctamente lo que el resultado del análisis de *clusters* de FAMEs había ya establecido pero aportando información adicional y complementaria al análisis de ácidos grasos.

Además, un estudio más detallado del análisis de *clusters* de FAMEs junto con la asignación taxonómica resultante de la secuenciación parcial nos ha permitido analizar la biodiversidad en función de la biogeografía de los cultivos aislados, tratando de establecer alguna relación entre la taxonomía de los mismos y el origen geográfico de los líquenes (Tabla 16).

Los resultados obtenidos de la identificación taxonómica derivada de la secuencia del gen ribosomal 16S confirma los resultados obtenidos con el análisis de FAMEs, con especies que forman parte de las comunidades microbianas de los líquenes en diferentes localizaciones y ecosistemas mientras que hay otras especies que habitan únicamente en ecosistemas específicos, pudiéndose aislar muchas de ellas de líquenes procedentes de geografías concretas. Este hecho puede deberse, como ya se ha comentado, a factores abióticos como clima, temperatura, régimen de lluvias, humedad ambiental, horas de luz, exposición al sol del líquen, etc. o a factores bióticos como puede ser la interacción entre el líquen, en cuanto a su propia taxonomía, producción de determinados metabolitos, etc. y el microhábitat que genera, y la comunidad microbiana que lo habita. Los resultados nos indican que un 45% de las 222 cepas aisladas y secuenciadas se asignan a 12 especies distintas que pueden aislarse indistintamente de diversos entornos ecológicos y geográficos. Sin embargo, el 55% de las cepas se aíslan exclusivamente de determinadas localizaciones, sugiriendo que las cepas de actinomicetos presentes en los líquenes

parece que siguen ciertos patrones biogeográficos, como ya han demostrado otros autores con cepas de actinomicetos aisladas de otros ecosistemas (Wawrik *et al.*, 2005 y 2007; Van der Gucht *et al.*, 2007; Edlund *et al.*, 2011). Aunque el número de cepas de especies únicas que pueden recuperarse exclusivamente de líquenes de zonas tropicales es muy superior al de las cepas de líquenes de Alaska (Tabla 16), vemos que algunas cepas asignadas a especies concretas, se obtienen solamente de estos líquenes como son las cepas de *Gordonia sputi*, de *Nocardia* sp o de *Pseudonocardia alni* así como algunas especies de *Streptomyces*. Además, entre los líquenes de Hawai, con líquenes arbóreos y saxícolas, vemos que la composición de las poblaciones de actinomicetos es distinta según el tipo de liquen o el ecosistema en el que éste habita. Entre las especies aisladas exclusivamente de líquenes de Hawai, observamos que hay especies que se aíslan únicamente, bien de líquenes arbóreos o bien de líquenes saxícolas, habiendo mayor abundancia de cepas (40) y de especies (21) en las procedentes de líquenes arbóreos que en las de los líquenes saxícolas (20 cepas de 14 especies distintas). Sólomente dos cepas de *Streptomyces lavendulae* fueron aisladas a la vez de un liquen arbóreo y de uno saxícola. También se observa que, aparte de numerosas especies de *Streptomyces* que se aíslan exclusivamente de líquenes de Hawai o de Reunión, hay especies de géneros minoritarios que se aíslan solamente de líquenes de una de las dos localizaciones. Las únicas cepas del género *Actinomadura*, o cepas de las especies *Actinoplanes deccanensis*, *Micromonospora tulbaghiaie* o de *Saccharothrix texasensis* se aislaron de líquenes de Hawai, mientras que las cepas del género *Actinomycetospora* spp., del género *Streptosporangium* spp o de especies de *Actinoplanes digitatis*, *A. cyaneus*, *Micromonospora aurantiaca*, *M. humi*, *M. peucetia* o *Pseudosporangium ferrugineum* lo fueron de líquenes de Reunión.

Como acabamos de comprobar, la distinta distribución de los diversos taxones según su origen indica que hay cepas con distinto grado de distribución geográfica, desde las que pueden recuperarse de cualquier origen (cepas cosmopolitas) hasta las que sólo se aíslan de forma exclusiva de un lugar geográfico determinado (cepas endémicas). (Cho y Tiedje, 2000; Kuo y Garrity, 2002; Whitaker *et al.*, 2003; Wawrik *et al.*, 2005; Edlund *et al.*, 2011) Estos resultados son similares a los obtenidos por Wawrik y colaboradores (2007) en el estudio realizado sobre actinomicetos aislados de suelos de Asia Central (Uzbekistán) y de Nueva Jersey. Según estos autores, existen diferencias entre las comunidades de actinomicetos presentes en suelos recogidos en ambas zonas debido a que existen diversos filotipos de actinomicetos que están ampliamente distribuidos pero parece que estos constituyen solo una pequeña proporción de los filotipos presentes en cada localización y que por tanto, solo componentes minoritarios de las poblaciones de actinomicetos son cosmopolitas. Además, distintas poblaciones de actinomicetos pueden encontrarse en suelos recogidos en diferentes regiones del mundo y que diferentes ecosistemas albergan poblaciones microbianas únicas, presentando las poblaciones de bacterias una distribución biogeográfica. El patrón de distribución por continentes de las poblaciones aisladas implica que ciertas especies de actinomicetos pueden encontrarse solo en ciertas regiones del mundo presentando cierto grado de endemismo. Similares resultados han obtenido Edlund y colaboradores (2011) con distintas cepas de la especie *Salinispora arenicola* recolectada en diferentes localizaciones geográficas concluyendo que subpoblaciones de *S. arenicola* son endémicas según las localizaciones.

5.1.4. Análisis filogenético de los actinomicetos.

El análisis filogenético de los actinomicetos se realizó con las secuencias parciales del gen 16S ARNr de las 222 cepas salvajes y de las 82 cepas tipo incluidas en el estudio utilizando el método de Neighbour Joining (Figuras 8, 8a, 8b, 8c y 8d). Nuestros resultados de los análisis filogenéticos confirman los obtenidos con el análisis de la composición de ácidos grasos, presentando los árboles generados por ambas aproximaciones la misma topología general, observándose, sólo en el caso del género *Streptomyces* algunos cambios locales o ramas formadas por cepas que estaban repartidas en varios *clusters* según el perfil de ácidos grasos. Sin embargo, para los otros grupos taxonómicos el paralelismo de los resultados observados con los dos tipos de análisis permite establecer una correlación que apoya los resultados obtenidos con ambas técnicas.

Además, como hemos visto con los análisis anteriores, volvemos a observar que algunas cepas presentan una distribución biogeográfica, aislándose numerosas especies exclusivamente de líquenes de localizaciones concretas. Nuestros datos indican que distintas poblaciones de cepas de actinomicetos pueden recuperarse de líquenes recolectados en diferentes lugares geográficos y que, aunque muchas especies son cosmopolitas y pueden aislarse de diversos entornos y localizaciones, hay otras muchas cepas que son endémicas o al menos presentan algún patrón biogeográfico, pudiéndose recuperar solamente de localizaciones únicas. Estos datos concuerdan con los publicados por otros autores que demuestran que los microorganismos presentan patrones de distribución biogeográficos y que algunas cepas sólo pueden recuperarse de entornos o localizaciones concretas, siendo los factores medioambientales locales un determinante clave de la composición de los taxones (Green y Bohannan, 2006; Martiny *et al.*, 2006; Van der Gucht *et al.*, 2007).

Como vemos, el empleo de la secuenciación parcial del gen 16S ADNr permite determinar y confirmar la posición taxonómica de las cepas aisladas, aunque esta aproximación es limitada dado el grado de heterogeneidad intraespecífica entre cepas de la misma especie obtenidas del mismo ambiente, lo que hace que sea necesario introducir herramientas de desreplicación adicionales para la selección de las cepas, como son las técnicas de PCR *fingerprinting*. (Genilloud *et al.*, 2011; Genilloud y Vicente, 2012; Genilloud y Vicente, 2014).

5.1.5. Evaluación de la diversidad según los perfiles de amplificación mediante PCR.

Aunque las secuencias del gen 16S ADNr se usan ampliamente para determinar las relaciones filogenéticas entre los organismos y determinar y confirmar la posición taxonómica de las cepas aisladas, se ha observado que, debido a la conservación de este gen, estas secuencias a menudo no son suficientemente divergentes para discernir entre organismos muy cercanos como en el caso de especies de un mismo género, o entre cepas de una misma especie, limitando de esta manera su poder para resolver relaciones cercanas (Fox *et al.*, 1992; Garcia-Martinez *et al.*, 1999; Soller *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2004). Hain y colaboradores (1997) vieron que el análisis de secuencia del 16S ADNr no tenía valor para poder discriminar entre cepas de *S. albidoflavus*, pero sin embargo demostraron la utilidad de utilizar otras técnicas para discernir entre estas cepas.

Debido a las limitaciones que presenta el análisis de las secuencias del gen 16S ADNr para distinguir entre organismos muy relacionados se hace necesario recurrir a otras técnicas con mayor poder de resolución que permitan discriminar entre los cultivos presentes en una población.

En consecuencia, se han desarrollado métodos y protocolos basados en el ADN para caracterizar los genomas de muchas bacterias, siendo los métodos de *fingerprinting* basados en PCR los que presentan una resolución taxonómica mayor que la secuenciación del gen ribosomal 16S ADNr (Vinuesa *et al.*, 1998). Una de las técnicas más usadas es la denominada rep-PCR, la cual emplea cebadores que corresponden a secuencias repetitivas del ADN y en donde se amplifican selectivamente mediante PCR numerosas bandas de longitud variable. La técnica de rep-PCR se ha utilizado para valorar la diversidad genética de las comunidades microbianas y para clasificar o diferenciar cepas estrechamente relacionadas dada la amplia distribución de estos elementos repetitivos en una gran diversidad de especies de bacterias, discriminando entre cepas y especies de bacterias (Versalovic *et al.*, 1991; Woods *et al.*, 1993; Versalovic *et al.*, 1998a y 1998b).

La experiencia ha demostrado que la técnica de rep-PCR, especialmente con los cebadores de ERIC y BOX, es bastante robusta y no está sujeta a la variabilidad encontrada con otros protocolos de amplificación mediante PCR, tales como la técnica de RAPD. El (los) cebador(es) más informativo(s) para un conjunto determinado de cepas depende de las poblaciones microbianas que se vayan a estudiar y del objetivo del análisis. Además, al contrario que el análisis del gen 16S ARNr que se basa en la información de un solo gen, el método de rep-PCR genera perfiles de amplificación según secuencias repartidas a lo largo todo el genoma, siendo por tanto un reflejo real de la estructura del genoma (Nick *et al.*, 1999; Louws *et al.*, 1994). Por otro lado, numerosos estudios han demostrado que existe una alta correlación entre las técnicas de rep-PCR con los valores de homología ADN-ADN (Vauterin *et al.*, 1992; Versalovic *et al.*, 1998a; Rademaker *et al.*, 2000; Lanoot *et al.*, 2004; Bathe *et al.*, 2006)

En este trabajo hemos estudiado los tres grupos mayoritarios de cepas (la familia *Micromonosporaceae*, la familia *Pseudonocardiaceae* y el género *Streptomyces*) mediante cuatro técnicas diferentes de rep-PCR (BOX-PCR, ERIC-PCR, REP-PCR y (GTG)₅) junto con otras dos técnicas de *fingerprinting* para detectar polimorfismos de longitud de cadena como son la técnica de tADN-PCR e IGS-PCR. Para los tres grupos analizados, las técnicas de rep-PCR fueron las que dieron mejor resultado tanto por el número de cepas que se podían analizar como, sobre todo, porque la complejidad de los patrones de bandas era muy superior a los obtenidos con tADN-PCR o IGS-PCR permitiendo de esta forma alcanzar un nivel de resolución muy superior y en consecuencia discriminar de forma más precisa entre las cepas aisladas.

Aunque la técnica de rep-PCR es claramente la que genera mejores resultados, existen diferencias entre ellas según el grupo taxonómico estudiado. Existen numerosos estudios en los que se han aplicado las técnicas de rep-PCR a diversos grupos taxonómicos (Versalovic *et al.*, 1991; De Bruijn, 1992; Olive y Bean, 1999; Vauterin *et al.*, 1995; Sadowsky *et al.*, 1996; Appuhamy *et al.*, 1997; Sander *et al.*, 1998; Vaneechoutte *et al.*, 1998; Burucoa *et al.*, 1999; Sikorski *et al.*, 1999; Kainz *et al.*, 2000; Lehtimäki *et al.*, 2000; Gevers *et al.*, 2001; Abd-El-Haleem *et al.*, 2002; Dawson *et al.*, 2002; Baldy-Chudzik

et al., 2003; Jonas *et al.*, 2003; Davelos *et al.*, 2004a; Davelos *et al.*, 2004c; Lanoot *et al.*, 2004; Peña *et al.*, 2004; Yamamura *et al.*, 2004; Bathe *et al.*, 2006; Foti *et al.*, 2006; Baines *et al.*, 2007) y según los casos, los resultados son diferentes favoreciendo el empleo de una u otra técnica aunque algunos autores afirman que, en general, el cebador BOX es el más recomendable dado que genera unos perfiles de amplificación robustos, reproducibles y suficientemente complejos (Louws *et al.*, 1995; Lanoot *et al.*, 2004), mientras que con la pareja de cebadores REP el nivel de complejidad es menor aunque también se generan patrones reproducibles y diferenciadores, siendo la pareja de cebadores ERIC la más sensible a condiciones de amplificación subóptimas, tales como la presencia de contaminantes en las preparaciones de ADN aunque también produce perfiles altamente discriminatorios (Rademaker *et al.*, 1997).

5.1.5.1. Diversidad de los cultivos de la familia *Micromonosporaceae*.

En el caso de la familia *Micromonosporaceae*, las cuatro técnicas dieron lugar, en general, a resultados muy parecidos en cuanto al número de cepas analizadas y a los *clusters* formados. Sin embargo, sí que se encuentran mayores diferencias en cuanto al número de OTUs obtenidas y el número de cepas únicas, es decir, OTUs formadas por una sola cepa. La técnica de ERIC-PCR fue la que permitió analizar un mayor número de cultivos, dando lugar a un mayor número de OTUs así como a un mayor número de cepas únicas, seguida por las técnicas de REP-PCR y de (GTG)₅ en cuanto al número de OTUs formadas y el número de cepas únicas. La técnica de BOX-PCR fue la que generó un menor número de OTUs y de cepas únicas, aunque también permite analizar un elevado número de cepas. Esta técnica ha sido empleada por otros autores para estudiar la diversidad de cepas de *Micromonospora* aisladas de nódulos de leguminosas (Alonso de la Vega, 2010; Trujillo *et al.*, 2010), obteniéndose buenos resultados a la hora de discriminar entre las cepas. En nuestro caso ERIC-PCR es el método que permite una mejor discriminación entre las cepas de la familia *Micromonosporaceae*. Este resultado es contrario al obtenido por otros autores para otro tipo de microorganismos, en donde la complejidad del patrón de bandas con los cebadores de ERIC fue menor que con los de REP, y en consecuencia, con los patrones de amplificación con ERIC fue más difícil hacer distinciones finas entre cepas (Versalovic *et al.*, 1991; Olive y Bean, 1999).

Además, con todas las técnicas de rep-PCR, con la excepción de REP-PCR, se observa una alta coherencia a nivel de la taxonomía de las cepas, puesto que cepas de la misma especie se agrupan, por lo general, en el mismo *cluster* o en *clusters* próximos. Las cepas de *M. humi*, de *M. peucetia* y *M. saelicesensis* de Reunión o las de *M. chokoriensis* y las de *M. tulbaghiae* de Hawai se agrupan repetidamente en el mismo *cluster*. En el caso del análisis con (GTG)₅, las cepas de *M. saelicesensis* se repartieron en varios *clusters* en vez de en uno solo como con otras técnicas. En el caso de REP-PCR, las cepas de *M. humi* y de *M. tulbaghiae* se siguen agrupando en los mismos *clusters*, aunque las otras especies que encontrábamos agrupadas con otras técnicas, se reparten ahora entre varios *clusters*. Sin embargo, para todas las técnicas, sí que encontramos una homogeneidad en cuanto a los orígenes, viéndose una tendencia clara de las cepas a agruparse según su procedencia geográfica.

Aunque, como hemos comentado, las técnicas de rep-PCR permiten agrupar en grandes *clusters* o ramas cepas de la misma especie así como resolver y distinguir las poblaciones aisladas de distintas localizaciones, permiten al mismo tiempo, según el punto de corte que se establezca, distinguir de forma precisa cultivos que están estrechamente relacionados, siendo por tanto técnicas con un alto poder de discriminación.

Para las otras dos técnicas de *fingerprinting* estudiadas, tADN-PCR e IGS-PCR, tanto el número de cepas analizadas como el número de OTUs resultantes fue muy inferior, sobre todo en el caso de IGS-PCR. Además, las cepas que con las otras técnicas aparecían juntas en el mismo *cluster* ahora se reparten entre varios *clusters* y no se observa una tendencia de las cepas a agruparse según su origen como ocurría antes sino que se entremezclan las cepas de distintos orígenes de forma heterogénea. Esto puede explicarse por la poca complejidad de los perfiles generados con ambas técnicas, en donde una gran proporción de cepas presenta perfiles con una o dos bandas, con lo que el poder de resolución no permite discriminar las distintas especies adecuadamente.

Nuestros resultados han demostrado que las técnicas de PCR son muy adecuadas para estudiar la diversidad de cepas de la familia *Micromonosporaceae* ya que permiten, en primer lugar, analizar un alto número de cepas, especialmente con las técnicas de ERIC-PCR, BOX-PCR y (GTG)₅. Contrariamente, la técnica de ácidos grasos es de aplicación limitada para este grupo de microorganismos dado el bajo número de cepas que se pueden estudiar en las condiciones de análisis estándar establecidas para actinomicetos. Además, según los índices de diversidad empleados, así como la riqueza y el número de cepas promedio estimados, la técnica de ERIC-PCR sería la técnica elegida para estudiar la diversidad de las cepas de la familia *Micromonosporaceae*, seguida de REP-PCR, (GTG)₅ y BOX-PCR.

Los valores de los índices de diversidad de Simpson (*D*) y de Shannon-Weiner (*H'*) nos indican que la diversidad de las cepas aisladas de la familia *Micromonosporaceae* es muy alta, especialmente con los resultados obtenidos con la técnica de ERIC-PCR, siendo en el primer caso del 99,04 % (cercano al valor máximo del 100%) y en el segundo un valor de 4,3998. Además, los valores de *riqueza* (*S*) o número de OTUs, así como el número de cepas únicas, fueron también muy elevados con esta técnica de *fingerprinting*.

5.1.5.2. Diversidad de los cultivos de la familia *Pseudonocardiaceae*.

En el caso de la familia *Pseudonocardiaceae*, las cuatro técnicas permitieron generar, en general y como en el caso de las cepas de la familia *Micromonosporaceae*, resultados muy parecidos no sólo en cuanto al número de cepas analizadas y a los *clusters* formados sino también en cuanto al número de OTUs obtenidas y el número de cepas únicas. Sin embargo, en este caso, con la técnica de REP-PCR se obtuvo un mayor número de OTUs y también un mayor número de cepas únicas, seguida por las técnicas de ERIC-PCR, (GTG)₅, BOX-PCR. Así pues, para la familia *Pseudonocardiaceae* la técnica de REP-PCR permite una mejor discriminación de las cepas en coincidencia con otros autores ([Versalovic et al., 1991](#); [Olive y Bean, 1999](#)).

Por otro lado, la capacidad para agrupar las cepas con la misma taxonomía dentro de los mismos *clusters* es muy similar, aunque con pequeñas diferencias, para todas las

técnicas de rep-PCR. Con casi todas las técnicas las cepas de *A. pretoriensis*, *A. kentuckyensis* y *P. alni* se agrupan en los mismos *clusters*. Como en el caso de las cepas de familia *Micromonosporaceae*, también se observa una tendencia clara de las cepas a agruparse según su origen lo que indicaría la capacidad de estos métodos para discriminar las poblaciones aisladas de distintos entornos.

En cuanto a las otras dos técnicas de *fingerprinting* empleadas, el número de cepas que pudieron estudiarse mediante IGS-PCR fue tan bajo que no puede sacarse ninguna conclusión con esta técnica. Sin embargo, para tADN-PCR tanto el número de cepas analizadas como el número de OTUs resultantes fue muy inferior al resto de técnicas empleadas, estando todas las cepas de *Amycolatopsis* agrupadas en el mismo *cluster*. Además, parece que existe una correlación entre los resultados obtenidos con esta técnica y los observados con FAMES.

Por último añadir que, según los índices de diversidad empleados, la técnica de ERIC-PCR sería la técnica elegida para estudiar la diversidad de las cepas de esta familia, seguida de REP-PCR, (GTG)₅ y BOX-PCR, siendo un resultado semejante al obtenido para la familia *Micromonosporaceae*.

Los valores de los índices de diversidad de Simpson (*D*) y de Shannon-Weiner (*H'*) nos indican que la diversidad de las cepas aisladas de la familia *Pseudonocardiaceae* no es tan alta como la encontrada con las cepas de la familia *Micromonosporaceae* o del género *Streptomyces*, incluso con los mayores resultados obtenidos con la técnica de ERIC-PCR, siendo en el primer caso del 92,41 % y en el segundo un valor de 2,5459. Además, los valores de riqueza (*S*) o número de OTUs, así como el número de cepas únicas, fueron menores con cualquiera de las técnicas de *fingerprinting*.

5.1.5.3. Diversidad de los cultivos del género *Streptomyces*.

En el caso del género *Streptomyces*, las cuatro técnicas de rep-PCR dieron lugar a resultados algo más heterogéneos en cuanto al agrupamiento de las cepas según sus taxonomías, aunque este resultado tiene que interpretarse desde la óptica de la propia taxonomía del género. Además, cada una de las cuatro técnicas difiere de las otras con respecto a alguno de los siguientes factores: número de cepas analizadas, número de OTUs obtenidas y/o número de cepas únicas. Si consideramos el conjunto y cada uno de estos factores, la técnica de REP-PCR fue la que tuvo los valores más bajos para los tres factores. Además, las bandas obtenidas estaban poco definidas y eran poco claras, dando lugar a una baja resolución para distinguir entre las cepas. Aparte de estos resultados, con esta técnica se observa que los *clusters* están integrados por cepas de distintas especies y que también se agrupan en un mismo *cluster* cepas con distinto origen. Sólo se pudieron analizar dos de las nueve cepas de *Streptomyces seoulensis*, estando además, cada una de ellas en un *cluster* distinto. Sin embargo, con las otras tres técnicas siempre se agrupan las cepas de *S. seoulensis* aisladas de Reunión.

Con todas las técnicas de rep-PCR, aunque en menor grado con REP-PCR, encontramos una homogeneidad en cuanto a los orígenes, viéndose una tendencia clara de las cepas a agruparse según su origen como también ocurre en los casos anteriores de las cepas de las familias *Micromonosporaceae* y *Pseudonocardiaceae*.

Con respecto a las otras dos técnicas de *fingerprinting* estudiadas, tADN-PCR e IGS-PCR, los resultados fueron relativamente parecidos a las técnicas de rep-PCR en cuanto al número de cepas analizadas pero no en cuanto al número de OTUs y el número de cepas únicas resultantes, ya que en ambos casos fueron muy inferiores. Además, como también ocurre con los otros dos grupos taxonómicos estudiados, no se observa una tendencia de las cepas a agruparse según su origen sino que se entremezclan las cepas de distintos orígenes de forma heterogénea. Los resultados obtenidos con estas técnicas son esperables si tenemos en cuenta el bajo número de bandas obtenido y el escaso rango del tamaño de las mismas.

En general podemos decir que las técnicas de PCR son muy adecuadas para estudiar la diversidad de cepas del género *Streptomyces*, aunque el número de cepas analizadas es menor que el que permite la técnica de FAMEs, probablemente debido al método de extracción de ADN empleado. Sin embargo, las técnicas de PCR *fingerprinting* permiten una mayor resolución y un nivel de discriminación más preciso para distinguir entre cepas muy relacionadas. Además, según los índices de discriminación empleados y otros parámetros para estimar la diversidad de las cepas, como la riqueza y el número de cepas promedio estimados, la técnica de (GTG)₅, seguida de ERIC-PCR y BOX-PCR serían las técnicas elegidas para estudiar la diversidad de las cepas este género. Hay que señalar que diversos autores han utilizado la técnica de BOX-PCR para analizar la diversidad de las cepas de *Streptomyces* (Sadowsky *et al.*, 1996; Davelos *et al.*, 2004a; Davelos *et al.*, 2004c; Baines *et al.*, 2007). También hay que decir que nuestros resultados no son del todo coincidentes con los obtenidos por Lanoot y colaboradores (2004). Estos autores hicieron un amplio estudio con cepas de referencia de *Streptomyces* y compararon los resultados obtenidos al utilizar diversas técnicas de rep-PCR. En este trabajo concluyeron que BOX-PCR era la técnica que producía unos patrones de bandas más robustos y reproducibles, existiendo, además, una alta correlación entre los perfiles de amplificación mediante de BOX-PCR y los datos de homología ADN-ADN, siendo por tanto la técnica más adecuada para distinguir entre cepas de *Streptomyces*.

Los valores de los índices de diversidad de Simpson (D) y de Shannon-Weiner (H') nos indican que la diversidad de las cepas aisladas del género *Streptomyces* es muy alta, especialmente con los resultados obtenidos con la técnica de GTG₅-PCR, siendo en el primer caso del 99,82 % (cerca del valor máximo del 100%) y en el segundo un valor de 4,4578. Además, los valores de *riqueza* (S) o número de OTUs, así como el número de cepas únicas, fueron también muy elevados con esta técnica de *fingerprinting*.

En general, podemos decir que las técnicas de PCR-*fingerprinting* nos permiten tener una visión más profunda y detallada de la diversidad de las cepas dentro de cada uno de los tres grupos taxonómicos mayoritarios en estudio. Nuestros datos han confirmado de nuevo la presencia de un grupo de cepas distinto dentro de las asociadas a la familia *Pseudonocardiaceae*, previamente identificados por el análisis de ácidos grasos. Además, nuestros resultados también han demostrado no sólo la riqueza y diversidad entre las cepas del género *Streptomyces* sino también entre los miembros de la familia *Micromonosporaceae* donde dos grupos distintos de cepas se han distinguido con total claridad según su origen geográfico.

Por último añadir que cuando comparamos los resultados obtenidos con diversas técnicas vemos que ERIC-, REP- y BOX-PCR generan resultados semejantes para el conjunto de cepas analizadas aunque esta semejanza es distinta si se hace la comparación para cada uno de los tres grupos taxonómicos mayoritarios. También hemos observado que estas técnicas permiten discriminar las distintas poblaciones recuperadas de los líquenes recolectados en distintas localizaciones, siendo nuestros resultados similares a otros trabajos como el llevado a cabo por Cho y Tiedje (2000) donde también se vio que la distancia genética entre los perfiles de BOX-PCR se correlacionaba bien con la distancia geográfica (Bull, 2004).

En cuanto a la estimación de la diversidad de las cepas en función de la técnica de *fingerprinting* empleada, hemos utilizado diversos parámetros para evaluarla así como dos índices de diversidad comúnmente empleados para estimar el poder discriminatorio de cada una de las técnicas (Hunter y Gaston, 1988; Hill *et al.*, 2003). Hunter y Gaston (1988) recomiendan utilizar el índice de diversidad de Simpson como un índice numérico que describa el poder discriminatorio de un sistema de caracterización. Este índice de discriminación debe tener un valor entre 0,438-0,899 y debe ser de al menos un 0,868 para un método de caracterización basado en ADN. En nuestro caso, hemos visto que el índice de Simpson es siempre superior para las *Micromonosporaceae* y *Streptomyces* estudiados para cualquiera de las técnicas de rep-PCR, así como para las cepas de la familia *Pseudonocardiaceae* salvo en el caso de BOX-PCR, aunque hemos podido comprobar que la menor diversidad de las cepas de esta familia se debe a que hay muchas cepas del género *Amycolatopsis* aisladas de líquenes de Hawai que son idénticas o muy similares cuando aplicamos técnicas genotípicas a pesar de la distinta morfología que presentan las mismas. Nuestros resultados son también comparables a los obtenidos por otros autores que han empleado las técnicas de rep-PCR con valores del índice de Simpson de 0,98-0,99 para REP-PCR (Buruco *et al.*, 1999) o de 95,18%, 93,22%, 88,28% y 82,59% para (GTG)₅, BOX, REP, y ERIC-PCR respectivamente (Mohapatra *et al.*, 2007) siendo los valores más altos observados entre las cepas aisladas de líquenes, los de ERIC-PCR (99,04% y 92,41%) para las cepas de las familias *Micromonosporaceae* y *Pseudonocardiaceae* respectivamente y del 99,82% para las cepas de *Streptomyces* analizadas con (GTG)₅. Estos valores indican que la diversidad de las cepas aisladas de líquenes recolectados en distintos entornos es muy elevada según demuestran las técnicas de caracterización genotípica empleadas. El otro índice empleado y recomendado por Hill y colaboradores (2003) para estimar la diversidad de filotipos es el índice de Shannon. Este índice H' tiene un valor de 0 si solo hay una especie, y alcanza su valor máximo si todas la especies del conjunto están representadas por un número igual de individuos (Zak y Willig, 2004). En la mayoría de los ecosistemas naturales H' varía entre 1 y 5. Entre las cepas de la familia *Micromonosporaceae* y del género *Streptomyces*, este índice es siempre mayor de 3,8 para todas las técnicas de rep-PCR. Sin embargo, para las cepas de la familia *Pseudonocardiaceae*, el índice de Shannon es menor variando entre 2,2504 (BOX-PCR) y 2,5459 (ERIC-PCR), siendo estos resultados similares a los obtenidos por Fierer y Jackson (2006), en suelos ácidos del Amazonas de Perú que presentan bajos niveles de diversidad bacteriana (H'= 2,5-2,7). Sin embargo, los resultados obtenidos con las cepas del género *Streptomyces* son superiores a los obtenidos por otros autores para este género con cepas aisladas de suelos, con valores entre a 3,07 y 3,74 para BOX-PCR (Davelos *et al.*, 2004c)

5.1.6. Distribución de sistemas biosintéticos: sistemas PKS-I, PKS-II, NRPS, APH y HMG CoA reductasa.

Las aproximaciones genómicas han demostrado que la mayoría de los genomas de bacterias carecen de *clusters* de genes implicados en el metabolismo secundario. Por tanto, dado que la capacidad de producir metabolitos secundarios está distribuida de forma heterogénea a lo largo de la enorme diversidad microbiana presente en la naturaleza, el aislamiento de nuevos microorganismos no implica necesariamente que sean productores de compuestos bioactivos, incluso aunque pertenezcan a la clase “*Actinobacteria*”. De hecho, algunas familias dentro de este orden no se han descrito como productoras de metabolitos secundarios. Por estas razones, es conveniente una rápida evaluación de las nuevas cepas aisladas analizando su capacidad biosintética, bien mediante la detección de actividades antimicrobianas, o bien detectando la presencia de genes implicados en la producción de metabolitos secundarios (Donadio *et al.*, 2005). En este último aspecto, está ampliamente aceptado que la aproximación de detectar secuencias de genes biosintéticos es una herramienta que permite obtener información interesante sobre la posible producción de metabolitos activos en los actinomicetos (Metsä-Ketelä *et al.*, 2002; Courtois *et al.*, 2003). Además, y relacionado con lo anterior, se ha demostrado mediante diferentes aproximaciones genómicas que exploran el potencial biosintético, que numerosos microorganismos tienen capacidades biosintéticas crípticas, tanto en microorganismos no conocidos como productores de compuestos bioactivos como en microorganismos productores pero que contienen numerosas rutas biosintéticas crípticas adicionales (Genilloud *et al.*, 2011; Oves-Costales y Challis, 2012).

La presencia de secuencias de sistemas PKS-I, PKS-II y NRPS en actinomicetos, se ha llevado a cabo en estudios previos en una amplia colección de cepas de referencia, detectadas con parejas específicas de oligonucleótidos, observándose una amplia distribución de estas secuencias en todos los taxones analizados (Ayuso, 2003; Ayuso-Sacido y Genilloud 2005). En estos trabajos se detectaron secuencias de los tres sistemas biosintéticos en la mayoría de las cepas que pertenecen a los grupos tradicionalmente productores de compuestos bioactivos como son el género *Streptomyces* o las familias *Micromonosporaceae*, *Actinosynnemataceae* (Labeda, *et al.*, 2011) y *Pseudonocardiaceae*, aunque en esta familia la frecuencia de secuencias PKS-II detectadas fue significativamente inferior, debido principalmente a la baja frecuencia de dicho sistema en los miembros del género *Pseudonocardia* (Ayuso, 2003). También se detectaron secuencias PKS y NRPS en cepas no productoras de compuestos conocidos y otras que pertenecen a grupos de actinomicetos minoritarios. Este es el caso de los miembros de las familias *Streptosporangiaceae*, *Thermomonosporaceae* y especialmente, *Nocardiaceae* donde las frecuencias de detección de los tres sistemas biosintéticos fueron muy elevadas a pesar de que no se han descrito compuestos derivados de la síntesis de sistemas PKS-I, PKS-II o NRPS en ninguna de las cepas analizadas. Además de estos estudios realizados con cepas de referencia, se han realizado también otros con cepas aisladas de diferentes entornos como muestras de suelo de Martinica (Ayuso *et al.*, 2005), de actinobacterias endofíticas (Li *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012), de sedimentos de cuevas marinas y de arrecifes de coral (Hodges *et al.*, 2012) o de esponjas marinas (Jiang *et al.*, 2008; Xin *et al.*, 2011) con el objetivo de detectar la presencia de genes PKS y NRPS para la selección de cepas con aplicaciones biotecnológicas.

En este trabajo también hemos estudiado la presencia de varias rutas de biosíntesis, observando que incluso entre cepas estrechamente relacionadas en base a su perfil de amplificación o secuencia, pueden encontrarse diferencias importantes en la presencia de estos genes metabólicos, lo cual puede usarse como un criterio adicional para la identificación de distintas cepas dentro los grupos que contienen cepas muy relacionadas. Además, las diferentes combinaciones de PKS-I, PKS-II, NRPS en las diferentes cepas que pertenecen a la misma especie indican una potencial diversidad de productos naturales distinta y una evolución genética divergente (Jiang *et al.*, 2008). En nuestro caso, la detección de sistemas PKS-I (62,4%), PKS-II (64,8%) y NRPS (58,3%) fue muy alta y muy similar para los tres sistemas en el conjunto de cepas. Estos resultados difieren en algunos aspectos a los obtenidos en los trabajos realizados con cepas de referencia así como en cepas aisladas de suelos de Martinica. El sistema NRPS es el que se detectó en menor proporción entre las cepas aisladas de líquenes (58,3%), siendo además esta frecuencia menor a la detectada en cepas aisladas de suelos de Martinica (66,3%) y muy inferior a la observada entre cepas de referencia (79,9%). Las frecuencias de detección de sistemas PKS-II fueron muy similares entre las cepas aisladas de líquenes, de suelos de Martinica y de cepas de referencia (64,8%, 64,4% y 67% respectivamente). Sin embargo, donde se observan mayores diferencias es en las frecuencias de los sistemas PKS-I, siendo las cepas aisladas de líquenes las que tienen unas tasas de detección mayores (62,4%) a las observadas entre las cepas de Martinica (51,7%) y entre las cepas de referencia (56,7%) (Ayuso, 2003; Ayuso *et al.*, 2005; Ayuso-Sacido y Genilloud 2005). Estas diferencias en las frecuencias de detección de estos tres sistemas también se observan en otros casos para cepas de actinobacterias aisladas de otros entornos como son cepas endofíticas (Li *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2012) o cepas aisladas de esponjas de diversos entornos como aguas profundas de la Antártida (Xin *et al.*, 2011) o del mar de China (Jiang *et al.*, 2008). La presencia de estos tres sistemas biosintéticos es muy variable según el tipo del sustrato a partir del cual se han aislado las cepas, variando la detección de sistemas PKS-I desde un 21,1% en cepas aisladas de plantas hasta un 80% en cepas de esponjas marinas; para sistemas PKS-II el rango de detección varía desde un 45,2% en los endófitos, hasta el 73% en las cepas marinas, siendo también muy variable la detección de sistemas NRPS, variando del 32,5% al 87% para las cepas endófitas y las marinas, respectivamente.

También hay que decir que, entre nuestras cepas de líquenes, se encuentran muchas diferencias en la presencia de los sistemas biosintéticos en función de los grupos taxonómicos que se estudien, así como en cuanto a los orígenes de las cepas. Por ejemplo, las frecuencias de detección de sistemas PKS-II, NRPS y APH fueron similares para los tres orígenes geográficos, encontrando sin embargo algunas diferencias en los casos de los sistemas PKS-I y HMG.

Los altos niveles de detección de los sistemas biosintéticos PKS-I, PKS-II y NRPS observados entre nuestras cepas confirman la amplia distribución de estos *clusters* biosintéticos en este grupo de bacterias como ya ha sido observado previamente tanto en cepas de referencia como en cepas silvestres (Ayuso, 2003; Ayuso *et al.*, 2005; Ayuso-Sacido y Genilloud 2005; Jiang *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2008; Xin *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2012). Nuestros resultados en *Streptomyces* contrastan con los esperados para este grupo tan productivo aunque hay que señalar que en estudios anteriores se ha observado en cepas silvestres una menor presencia, incluso entre cepas activas de *Streptomyces* aisladas de

plantas (Li *et al.*, 2008), cuando se comparan con las poblaciones enriquecidas de cepas de referencia productoras (Ayuso *et al.*, 2005; Ayuso-Sacido y Genilloud 2005). Para este grupo de cultivos, los sistemas PKS-II fueron los que se detectaron con mayor frecuencia, mientras que las rutas NRPS son las que se detectaron en menor proporción siendo muy inferiores a las detectadas en otros grupos microbianos ensayados con los mismos cebadores. Para el grupo de las cepas de la familia *Micromonosporaceae*, las tasas de detección mayores fueron para los sistemas PKS-I, NRPS y PKS-II. Las frecuencias de los sistemas PKS son claramente superiores a las detectadas en cepas aisladas de suelos y en el caso del sistema PKS-I incluso muy superior a las frecuencias detectadas en cepas de referencia. Sin embargo, el porcentaje de cultivos con sistemas NRPS es muy similar al descrito tanto para cepas aisladas de suelos como para cepas de referencia y además es concorde con resultados anteriores obtenidos en otras cepas tropicales del mismo género (Ayuso *et al.*, 2005).

En el caso de las cepas de la familia *Pseudonocardiaceae* existen grandes diferencias según el género que se estudie. En las cepas del género *Amycolatopsis* se detectan los tres sistemas con unas frecuencias muy altas, especialmente PKS-I y NRPS, siendo éstas las más altas de todos los grupos taxonómicos estudiados. Por el contrario, los cultivos del género *Pseudonocardia* presentan unas frecuencias muy inferiores a las detectadas para el género *Amycolatopsis* pero son, sin embargo, mayores que las encontradas en cepas de referencia para los sistemas NRPS y especialmente para PKS-II siendo comparables para el sistema PKS-I.

En resumen, podemos decir que entre las cepas de *Streptomyces* el sistema que se detecta con más frecuencia es el PKS-II mientras que en las cepas de la familia *Micromonosporaceae* y el género *Amycolatopsis* son los sistemas PKS-I y NRPS siendo PKS-II el menos frecuente.

También hemos podido comprobar que cepas de algunas especies recuperadas de varias localizaciones presentan diferencias en cuanto a las frecuencias de detección de sistemas biosintéticos en función del origen de las mismas. En las 2 cepas de *M. saelicesensis* de Alaska se detectan rutas PKS-I, así como en 5 de las 8 de Hawai pero no se observa este sistema en ninguna de las 4 cepas de Reunión. De las 4 cepas de *Streptomyces arenae* se detectan los tres sistemas en cepas procedentes de Hawai pero ninguno de ellos en la única cepa aislada de Reunión. También se encuentran diferencias de detección en las 2 cepas de *S. pactum*, detectándose el sistema PKS-I en la cepa de Alaska y no en la de Hawai. Por último, vemos que de las 3 cepas de *S. drozdowiczii*, sólo se detecta el sistema PKS-II en la única cepa aislada de Reunión y en ninguna de las dos de Hawai.

En base a los datos de amplificación por PCR se observa que hay variaciones geográficas en cuanto a la presencia de estas rutas biosintéticas. Nuestro trabajo aporta evidencia adicional de que subpoblaciones de actinomicetos en localizaciones específicas pueden mantener diferentes grupos de genes de metabolitos secundarios a los de otras localizaciones. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros grupos de investigación que han demostrado que subpoblaciones de bacterias obtenidas de localizaciones específicas pueden mantener distintos grupos de genes biosintéticos demostrando que la localización puede influir en el metabolismo secundario y que el

metabolismo secundario está unido a la adaptación ecológica a un entorno determinado (Penn *et al.*, 2009; Hodges *et al.*, 2012). En consecuencia, muestrear poblaciones en lugares distantes puede favorecer el descubrimiento de nuevos productos naturales y apoya al uso de técnicas moleculares para identificar rápidamente cepas que poseen distintos grupos de genes biosintéticos. Los perfiles de genes de metabolitos secundarios endémicos pueden ser una característica relativamente común a especies de bacterias ampliamente distribuidas (Wawrik *et al.*, 2005; Edlund *et al.*, 2011).

En el caso de la detección de secuencias HMG, gen asociado a la síntesis de compuestos isoprenoides, las tasas de detección han sido superiores a las encontradas en otros entornos por otros autores, detectándose su presencia en un 3,5% de las cepas ensayadas frente al 1,19% de las detectadas en cepas aisladas de marismas (Sigmund *et al.*, 2003), o el 1,15% de las observadas en actinobacterias aisladas de muestras marinas (Khan *et al.*, 2010; Izumikawa *et al.*, 2010). En cualquier caso, todos los resultados sugieren que la presencia de la ruta del mevalonato para la producción de isoprenoides como metabolitos secundarios es poco frecuente entre los actinomicetos. Sin embargo, estos autores han detectado la presencia de estas rutas en diversos grupos taxonómicos mientras que nosotros sólo la hemos detectado en cepas de *Streptomyces* aislados de Hawai y en cepas de *Micromonospora* aisladas de los tres orígenes geográficos.

En este estudio también hemos empleado cebadores específicos de genes que codifican para las enzimas APH en actinomicetos con el fin de detectar potenciales productores de aminoglicósidos aunque en nuestro caso, las tasas de detección han sido ligeramente inferiores (10,4%) a las encontradas por Anderson y colaboradores (2002) en cepas aisladas de suelos agrícolas de Costa Rica (17%) o en marismas costeras de Estados Unidos (12,5%). Sin embargo, a pesar de que la presencia de estas secuencias es baja, las hemos detectado en un amplio número de taxones, estando presentes en cepas de los géneros *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Micromonospora*, *Pseudonocardia*, *Streptomyces* y en micelios estériles, detectándose a su vez en los tres orígenes geográficos.

En cuanto a la detección de sistemas biosintéticos en otras cepas pertenecientes a grupos minoritarios y aisladas en menor número, no pueden sacarse conclusiones claras debido al bajo número estudiado. En cualquier caso, nuestros resultados son coincidentes con los obtenidos para cepas aisladas de suelos y también para cepas de referencia. Por ejemplo, en la única cepa de *Nocardia* aislada, se detecta la presencia de los tres sistemas biosintéticos principales, así como en las dos cepas de *Streptosporangium*. En la cepa de *Planobispora*, en la de *Geodermatophilus* y en la de *Saccharotrix* se detecta la presencia de sistemas PKS-I y PKS-II pero no de NRPS. En las cepas de *Actinomadura* se detectan los tres sistemas aunque no en todas ellas. Por último, en las cepas de *Gordonia* se detecta la presencia de PKS-II y de NRPS pero no de PKS-I.

Nuestros datos refuerzan los resultados obtenidos por otros (Metsä-Ketelä *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2008; Gontang *et al.*, 2010), que sugieren que bacterias con alta similitud en las secuencias de los genes 16S rRNA pueden presentar diferentes capacidades para producir moléculas bioactivas y apoyan la utilidad de usar métodos para la detección de genes PKS y NRPS para la selección de cepas con el objetivo de obtener aplicaciones biotecnológicas, si bien es cierto que la presencia de genes biosintéticos en nuevas cepas

aisladas no implica necesariamente una relación específica con la bioactividad (Courtois *et al.*, 2003; Hodges *et al.*, 2012; Xin *et al.*, 2011).

5.1.6.1. Diversidad de las cepas según su potencial biosintético.

El aislamiento de un elevado número cepas similares morfológicamente a partir de una misma muestra precisa disponer de métodos rápidos de selección que permitan eliminar los duplicados y aumentar la diversidad de la colección de cepas seleccionadas a estudiar. Como método adicional, la estrategia de realizar una búsqueda con cebadores para PCR para la detección de genes que potencialmente codifican para enzimas implicadas en la biosíntesis de compuestos bioactivos, ha demostrado ser una aproximación efectiva y ampliamente utilizada para detectar metabolitos secundarios nuevos (Sosio *et al.*, 2000; Xin *et al.*, 2011). Además, debido a la organización modular de los genes PKS-I y NRPS y a que muchas cepas de actinomicetos normalmente contienen más de un *cluster* de PKS-I, NRPS y de PKS-II, cada banda amplificada puede consistir en diferentes secuencias originadas a partir de un único *cluster* o de diferentes *clusters* (Busti *et al.*, 2006). Esto permite que las cepas puedan seleccionarse no sólo en base a la detección de genes biosintéticos sino, complementariamente, mediante el posterior análisis de sus patrones de restricción que pueden suministrar información adicional sobre su diversidad y su exclusividad desde una perspectiva biosintética (Genilloud *et al.*, 2011).

Siguiendo la aproximación polifásica planteada en este trabajo, hemos utilizado diversos métodos de caracterización para estudiar el potencial para producir metabolitos secundarios, especialmente los sintetizados por sistemas NRPS, PKS-I y PKS-II, junto con métodos de *fingerprinting* basados en el análisis de los patrones de restricción de los productos amplificados, permitiendo de esta forma no sólo detectar la presencia de los mismos sino también comparar la diversidad de los productos de amplificación.

Se ha observado que los perfiles de restricción de los productos amplificados con los oligonucleótidos específicos de sistemas PKS-I, PKS-II y NRPS son, en general, muy diferentes entre los tres grupos mayoritarios de actinomicetos. Los miembros de la familia *Micromonosporaceae* presentan perfiles de restricción complejos, con mayor número de bandas para los sistemas PKS-I, siendo más sencillos para PKS-II y para NRPS en algunas cepas. Un mayor número de bandas puede ser indicativo de la presencia de varios *clusters* pertenecientes al mismo sistema biosintético, lo que reflejaría un mayor potencial para sintetizar metabolitos secundarios. Algo parecido ocurre para las cepas de *Streptomyces*, en el caso de PKS-II y sobre todo para NRPS. Sin embargo, las cepas de *Pseudonocardia* presentan un alto número de bandas en los tres sistemas.

La posibilidad de combinar en un único análisis los tres perfiles de digestión de los productos amplificados, nos permite evaluar con mayor precisión la diversidad de los cultivos según su potencial metabólico. En el caso tanto de las cepas de la familia *Micromonosporaceae* como del género *Streptomyces* se observa un comportamiento parecido, viendo que no existe, en general, una correlación entre el potencial metabólico de las cepas y la taxonomía de las mismas, puesto que cepas con la misma taxonomía se reparten entre diversos *clusters* lo que indicaría que tendríamos cepas con un potencial biosintético diferente. Como hemos comentado en el apartado anterior, estos resultados

concuerdan con los obtenidos por otros grupos de investigación y refuerzan la idea de que subpoblaciones de bacterias obtenidas de localizaciones específicas pueden mantener distintos grupos de genes biosintéticos demostrando que la localización puede influir en el metabolismo secundario (Wawrik *et al.*, 2005; Penn *et al.*, 2009; Edlund *et al.*, 2011; Hodges *et al.*, 2012). También se observan algunos casos de cepas con igual taxonomía que se agrupan en el mismo *cluster*, es decir, presentan perfiles de restricción similares y, por consiguiente, podrían ser duplicados de la misma cepa. Por último, hay que destacar que en ambos grupos de cultivos se encuentran cepas con perfiles de restricción únicos, sugiriendo que podrían tener un potencial metabólico diferente al resto de las cepas.

Al contrario de lo que sucedía en las cepas de la familia *Micromonosporaceae* y del género *Streptomyces*, para las cepas de la familia *Pseudonocardiaceae* sí que parece existir una correlación entre la taxonomía de las cepas y el perfil de restricción de las mismas, ya que casi todos los *clusters* están integrados por cepas con la misma taxonomía. Esto confirmaría que las cepas que se agrupan en los distintos *clusters* serían diversos clones de la misma cepa aislados repetidamente y seleccionados en un primer momento por su distinta morfología. Éste sería el caso de las 14 cepas de *Amycolatopsis pretoriensis* aisladas de Hawái que se agrupan en el mismo *cluster* y que corresponderían a especímenes similares de la misma cepa con el mismo potencial metabólico, o las dos cepas de *Amycolatopsis kentuckyensis* aisladas de Reunión y las dos cepas de *Pseudonocardia alni* aisladas de Alaska que presentan, en ambos casos, perfiles de restricción idénticos. También existen algunas cepas con perfiles de restricción únicos, sugiriendo que podrían tener un potencial metabólico diferente al resto de las cepas.

Los resultados obtenidos apoyan la eficacia y las ventajas del método de selección de cepas basado en la combinación de los perfiles de restricción de los tres sistemas biosintéticos, suministrando información adicional sobre su diversidad y su exclusividad desde una perspectiva biosintética, pudiendo utilizarse como una valiosa herramienta adicional para la selección de nuevas cepas salvajes de muestras ambientales.

5.1.7. Actividad antimicrobiana y presencia de sistemas biosintéticos en cepas salvajes de actinomicetos.

Aunque el empleo de métodos para detectar la presencia de rutas biosintéticas es un indicador del potencial metabólico, las cepas tienen todavía que cultivarse en unas condiciones en las que puedan expresar la ruta, y someterse después a un ensayo biológico adecuado que detecte la presencia del metabolito secundario expresado. Por estas razones, una vez determinado el potencial metabólico de nuestras cepas, utilizamos una aproximación rápida y sencilla para determinar la capacidad de las cepas para producir metabolitos secundarios con actividad biológica. Los resultados del ensayo biológico frente a un pequeño panel de cepas ha permitido ver que alrededor del 30% de los cultivos ensayados producían alguna actividad frente a alguna de las tres cepas diana ensayadas. Este porcentaje de cultivos en los que se observa alguna actividad antimicrobiana es inferior al encontrado habitualmente entre cepas aisladas de suelos, como es el caso de las cepas de actinomicetos aisladas de suelos tropicales de Martinica, donde un 47% de las mismas presentaban algún tipo de actividad (Ayuso *et al.*, 2005),

aunque son similares a los encontrados en actinomicetos aislados de esponjas del mar de China (27,5%) (Xi *et al.*, 2012).

Las actividades se han detectado en la mayoría de los taxones analizados aunque existen claras diferencias en el porcentaje de cepas activas en función de la taxonomía que se estudie. Además también se han observado marcadas diferencias en función del origen geográfico de las cepas, ya que la mayoría de las actividades se encontraron en cepas aisladas de zonas tropicales, con un porcentaje similar entre las cepas de Hawai y de Reunión, mientras que entre las cepas aisladas de Alaska el porcentaje fue muy bajo, encontrándose sólo actividades en algunas cepas de *Streptomyces*, en una proporción muy inferior al de los *Streptomyces* aislados de zonas tropicales. Este hecho podría estar relacionado con la distinta composición de las comunidades microbianas aisladas de líquenes de Alaska y de zonas tropicales, tanto en el número de cepas que habitan en los mismos como las interacciones entre las distintas cepas dentro de la comunidad. El menor número de cepas activas podría ser reflejo de la menor competencia que existe entre ellas como consecuencia de la escasa abundancia de cepas que habitan en estos líquenes, no estando sometidas a tanta presión selectiva como los microorganismos que habitan los líquenes tropicales.

Respecto a las diferencias que encontramos según la taxonomía, vemos que el mayor porcentaje de cepas activas se encuentra entre los miembros del género *Amycolatopsis*, probablemente debido al hecho, al menos en parte, de tener varias cepas idénticas o muy similares. En este caso, además, es el grupo en el que también se detecta mayor frecuencia de rutas biosintéticas, lo que permitiría establecer una correlación entre la presencia de rutas de biosíntesis de metabolitos secundarios y el número de actividades detectadas, aunque hay que señalar que la presencia de rutas biosintéticas es parecida entre las cepas activas y las inactivas, salvo en el caso de rutas tipo PKS-II que se detecta en el 66,7% de las cepas activas y no se encuentra entre las cepas inactivas. En este caso, parece que sí podríamos establecer una correlación entre la presencia de este sistema y la producción de actividades antimicrobianas. En cualquier caso, estos resultados no son sorprendentes si tenemos en cuenta que numerosos miembros del género *Amycolatopsis* son conocidos productores de diversas moléculas bioactivas como compuestos β -Lactámicos o glicopéptidos. Además, Genilloud y colaboradores (2011) describen que sólo en el 47% de las cepas de *Amycolatopsis* con actividades antibacterianas y/o antifúngicas se detectan compuestos conocidos por LC-MS al enfrentarse a una base de datos propia con compuestos antibióticos conocidos. En consecuencia, nuestros datos corroboran el gran potencial metabólico de estas cepas para producir compuestos bioactivos novedosos.

El porcentaje de *Streptomyces* con actividad antimicrobiana fue inferior al descrito en otros trabajos de cepas aisladas de suelos o de medios acuáticos (Holmalahti *et al.*, 1994; Saadoun *et al.*, 1999; Sponga *et al.*, 1999; Ouhdouch *et al.*, 2001; Basilio *et al.*, 2003). Sin embargo, la producción de actividades antimicrobianas en este grupo no ha podido ser relacionada directamente con la presencia de rutas biosintéticas, a pesar de que se detectan en al menos el 80% de los cultivos de *Streptomyces*. Además, la presencia de las tres rutas biosintéticas principales estudiadas en este trabajo no se distribuye de la misma forma entre las cepas activas e inactivas. La presencia de rutas tipo PKS-I se observa en la misma proporción entre las cepas activas y las inactivas así como

el sistema PKS-II, aunque en este caso se detecta ligeramente más entre las cepas activas. Sin embargo, la presencia de sistemas NRPS se presenta en mayor proporción entre las cepas inactivas que entre las activas.

Con respecto a las cepas de la familia *Micromonosporaceae*, sorprende el bajo porcentaje de cepas activas encontrado si tenemos en cuenta que el 94% de los cultivos estudiados presenta alguna ruta de biosíntesis de metabolitos secundarios. Estos resultados sugieren que a pesar de la falta de actividad biológica, la familia *Micromonosporaceae* presenta un gran potencial genético para sintetizar metabolitos derivados de sistemas PKS y NRPS. Aunque el bajo número de actividades detectadas en los miembros de la familia *Micromonosporaceae* no permite establecer con claridad su posible relación con la frecuencia de detección de sistemas biosintéticos en estos grupos de actinomicetos, vemos que los sistemas PKS-II, NRPS y STR se detectan más entre las cepas activas que la inactivas, ocurriendo lo contrario para la ruta PKS-I que se detecta en mayor proporción entre las cepas inactivas. A pesar del alto número de cepas con alguna ruta biosintética vemos que el bajo número de actividades antimicrobianas detectadas dentro de este grupo parece indicar que dichos sistemas biosintéticos se expresan sólo bajo determinadas condiciones de crecimiento, o bien no se detectan actividades porque estos sistemas están implicados en la síntesis de compuestos sin actividad antimicrobiana. Estos resultados coinciden con los descritos en los trabajos de Ayuso (2003) y Ayuso y colaboradores (2005) en los que se detecta un bajo número de actividades biológicas entre las cepas de *Micromonospora* pero sí se observa la presencia de numerosas rutas PKS-I, PKS-II y NRPS. El desarrollo de nuevos medios y condiciones de crecimiento que faciliten la expresión de dichos sistemas crípticos podrían permitir la obtención de nuevos compuestos bioactivos producidos por miembros de este grupo de actinomicetos. Además, un mayor conocimiento de los mecanismos que modulan la expresión de genes que conducen a la producción de metabolitos secundarios, no solo en *Streptomyces*, sino también en otros grupos taxonómicos de actinomicetos, podría redundar en un aprovechamiento del potencial biosintético de grupos hasta el momento poco prolíficos como *Streptosporangiaceae*, *Thermomonosporaceae* o *Nocardiaceae* entre otros.

Finalmente, nuestros datos apoyan la idea de que especies de “*Actinobacteria*” aisladas de líquenes presentan un importante potencial para producir compuestos bioactivos, a pesar del relativamente pequeño número de actividades antimicrobianas obtenidas en algunos de los grupos ensayados. Además, hay que tener presente que la detección inicial de actividades biológicas se realizó disponiendo tacos de agar sobre un césped de las cepas diana de ensayo y que este método, aunque se ha utilizado tradicionalmente como una aproximación inicial para detectar rápidamente actividades antimicrobianas (Davies *et al.*, 2005; Busti *et al.*, 2006), puede influir en el resultado final del experimento dadas las pocas condiciones de cultivo usadas para la producción de actividades. También hay que considerar que el uso en nuestros ensayos de cepas resistentes a familias de antibióticos, muchas de las cuales producidas por actinomicetos, influye en el número de actividades observadas. Por último, hay que tener en cuenta que la ausencia de actividades puede ser reflejo de la falta de expresión de algunos de los sistemas biosintéticos en las condiciones de ensayo empleadas o su implicación en otros procesos biosintéticos no relacionados con la producción de compuestos antimicrobianos. La implicación de muchos de estos sistemas en la biosíntesis de pigmentos, de componentes estructurales de la pared celular o de otros metabolitos secundarios inactivos

como antimicrobianos es bien conocida ([Blanco et al., 1993](#); [Omura et al., 2001](#); [Portevin et al., 2004](#)). En cualquier caso, la amplia distribución de secuencias biosintéticas del tipo PKS y NRPS contrasta enormemente con la escasa detección de secuencias APH y HMG. La presencia de secuencias HMG CoA exclusivamente en cepas inactivas sugiere que estos sistemas, y por tanto la ruta del mevalonato normalmente asociada con la biosíntesis de compuestos isoprenoides en actinomicetos, no están expresados en las condiciones ensayadas o no están implicados en la producción de compuestos bioactivos frente al panel de cepas usadas.

En resumen, podemos afirmar que nuestro trabajo aporta datos adicionales que confirman la amplia distribución de los sistemas biosintéticos PKS-I, PKS-II y NRPS entre las cepas de actinomicetos y que también están presentes estas rutas entre las cepas aisladas de líquenes en frecuencias similares a las descritas para cepas aisladas de otros entornos siendo por tanto los líquenes un nicho alternativo para el aislamiento de actinomicetos con un gran potencial biosintético. También se ha observado, como en los trabajos realizados por otros autores ([Ayuso, 2003](#); [Ayuso et al., 2005](#); [Li et al., 2012](#)), que la presencia de rutas PKS y NRPS no se correlaciona con las actividades antimicrobianas producidas por algunas cepas. Esta falta de correlación probablemente sea resultado de las condiciones de crecimiento usadas o a la síntesis de otros tipos de compuestos sin actividad antimicrobiana.

5.1.8. Diversidad de los metabolitos secundarios de las cepas de la familia *Pseudonocardiaceae*.

Como se ha demostrado, tanto por los análisis de secuencia de los genomas como experimentalmente, casi todos los linajes de actinomicetos contienen genes biosintéticos y tienen en consecuencia el potencial para producir compuestos bioactivos. Sin embargo, en la mayoría de los casos, estos genes están todavía sin explotar aunque activando estas rutas silentes se podría poner de manifiesto la producción de nuevas moléculas ([Donadio et al., 2002b](#); [Ayuso-Sacido y Genilloud, 2005](#); [Donadio et al., 2005](#); [Busti et al., 2006](#); [Donadio et al., 2007](#)). Además, la mayoría de los actinomicetos contienen varias rutas de biosíntesis en sus genomas por lo que un mismo microorganismo sería capaz de producir varios compuestos. Esta capacidad para producir más de un compuesto es la aproximación propuesta por Bode y colaboradores (2002) de OSMAC (*One Strain, Many Compounds*), que consiste en maximizar la productividad de un único microorganismo mediante la activación de los genes biosintéticos silentes o crípticos aumentando las condiciones de cultivo. Esta aproximación se basa en el hecho de sobra conocido de que el perfil metabólico de una cepa de actinomiceto depende de los medios de cultivo empleados para su crecimiento y que condiciones selectivas de crecimiento son determinantes a la hora de inducir la producción de un compuesto ([Schimana et al., 2001](#); [Zazopoulos et al., 2003](#); [Wang et al., 2006](#); [Rateb et al., 2011](#)).

Una forma para explotar la estrategia de OSMAC es el empleo de múltiples condiciones nutricionales usando sistemas miniaturizados de fermentación en paralelo en microplacas de 96 pocillos ([Duetz et al., 2000](#); [Minas et al., 2000](#); [Duetz, 2007](#)) puesto que aumentando el número de medios de fermentación, se incrementa la diversidad metabólica de una cepa y en consecuencia la probabilidad de detección de metabolitos bioactivos

producidos por las mismas. Esto se puede conseguir por medio de *arrays* nutricionales que pueden explotar mejor, con un coste mínimo, el potencial metabólico de las cepas. Experimentalmente se ha demostrado que aumentando el número de condiciones nutricionales se aumenta el número de actividades antimicrobianas, alcanzando una meseta cuando se emplean 6-8 medios (Bills *et al.*, 2008; Genilloud *et al.*, 2011).

Sin embargo, el redescubrimiento, una y otra vez, de moléculas conocidas crea la necesidad de mejorar los métodos analíticos y de aislamiento químico que aseguren una rápida detección y caracterización de los compuestos que permitan identificar y eliminar estas moléculas conocidas del proceso tan pronto como sea posible (Busti *et al.*, 2006; Genilloud *et al.*, 2011; Hou *et al.*, 2012).

Tratando de aplicar la aproximación de OSMAC, seleccionamos como modelo de estudio el grupo de cepas de la familia *Pseudonocardiaceae* para tratar de maximizar los metabolitos secundarios producidos por este grupo de cepas que presentaban inicialmente un elevado número de actividades antimicrobianas y en el que además se detectaban también un alto número de rutas biosintéticas tipo PKS-I, PKS-II o NRPS.

El estudio de microfermentaciones llevado a cabo con las cepas de la familia *Pseudonocardiaceae* nos ha permitido, no sólo reproducir en la práctica totalidad de los casos las actividades inicialmente detectadas sino confirmar que el aumento en el número de condiciones de fermentación permite incrementar el número de actividades observadas, explotando el potencial metabólico de estas cepas. En este caso, hemos visto que el medio inicialmente empleado (YME) sigue produciendo un alto número de actividades aunque el empleo de medios adicionales permite ampliar el número de las mismas con otros medios más productivos. También hemos podido determinar por un lado, que aunque los dos tiempos de incubación usados dan buenos resultados, tiempos más largos producen mayor número de actividades y por otro que los medios líquidos son capaces de inducir un mayor número de actividades que los medios sólidos. Nuestros resultados aportan datos adicionales que confirman que condiciones selectivas de crecimiento pueden inducir la expresión de algunas rutas biosintéticas y la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana.

Cabe señalar también que para este grupo taxonómico estudiado parece que se puede establecer una relación entre el número de actividades producidas y la fuente de carbono empleada en la composición de los medios usados puesto que los medios que produjeron mayor número de actividades contienen como fuentes de carbono, azúcares sencillos como monosacáridos o disacáridos, mientras que aquellos medios que contienen fuentes de carbono más complejas como dextrina de maíz o almidón de patata, son los que menos actividades produjeron. Llama también la atención el caso de los medios DEF15-Sc y DEF-15, cuya única diferencia en composición es la adición de escandio, que parece mejorar el número de actividades que se detectan. Sin embargo, con respecto a las fuentes de nitrógeno, no se observa una correlación entre la complejidad de las fuentes empleadas y el número de actividades observadas porque hay medios con fuentes complejas que producen muchas actividades, mientras que otros producen pocas, o medios que han producido muchas actividades que contienen fuentes de nitrógeno simples como cloruro amónico.

Con respecto a los metabolitos producidos y analizados mediante LC-MS, vemos que sólo en una de las 14 cepas de *Amycolatopsis pretoriensis* aisladas de Hawai se detectaron compuestos conocidos. Además, no sólo esta cepa sino todos los cultivos de *A. pretoriensis* fueron activos, bien sólo en taco (2 cepas), sólo en microfermentación Duetz (1 cepa) o en ambos formatos (11 cepas), si bien, sólo en la cepa comentada se detectaron estos compuestos. Las cepas en las que no se detectaron compuestos conocidos serán objeto de posteriores estudios, comparando los respectivos perfiles de HPLC y espectrometría de masas para tratar de determinar la similitud o diferencia de los perfiles metabólicos y poder estudiar, si efectivamente, cepas fenotípica y genotípicamente iguales son capaces de producir distintos metabolitos, si producen los mismos metabolitos pero hay diferencias cuantitativas, etc. Este grupo de cepas parece ser un nuevo ejemplo de microorganismos que pueden parecer idénticas pero producir metabolitos secundarios diferentes y confirmar el hecho descrito por otros autores que la química no siempre se correlaciona con los árboles filogenéticos del 16S (Hou *et al.*, 2012). El hecho de que prácticamente todas las cepas de *Amycolatopsis* sean activas hace que éste género siga siendo de gran interés en la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos con interés biotecnológico, como ya han apuntado otros autores (Okoro *et al.*, 2009; Zucchi *et al.*, 2012).

Por otro lado, es bien conocido el hecho de que cepas taxonómicamente muy próximas pueden producir compuestos diferentes y tienen genes de biosíntesis de diversos antibióticos, mientras que al contrario, cepas muy distantes taxonómicamente tienen genes de biosíntesis de antibióticos iguales o muy similares. Esto puede explicarse por sucesos de transferencia genética horizontal, lo cual puede suponer una ventaja selectiva que da lugar a que cepas taxonómicamente similares tengan perfiles de producción de metabolitos secundarios diferentes (Vilella *et al.*, 2000; Busti *et al.*, 2006; Baines *et al.*, 2007).

En un estudio llevado a cabo por Genilloud y colaboradores (2011) tratando de correlacionar los datos taxonómicos con los compuestos que producían cepas activas de actinomicetos, observaron que un 22% de las cepas se detectaba por LCMS algún tipo de molécula conocida e incluida en la base de datos *Gold*. Sin embargo, el patrón de frecuencias de detección de compuestos conocidos era muy diferente en función del grupo taxonómico. En el caso de cepas de *Streptomyces*, un 42% de las mismas producía moléculas conocidas. Por el contrario, en el caso de otros géneros de actinomicetos, el patrón de detección fue completamente distinto, encontrándose sólo en un 19% de los casos compuestos conocidos. Además, la presencia de estos compuestos variaba en función del taxón estudiado, variando desde un 5% en las cepas de *Actinomadura*, a un 9% en las cepas de *Nocardia*, 13% en cepas de *Micromonospora*, 21% en cepas de *Actinoplanes*, hasta un 38% y 47% en cepas de *Pseudonocardia* y *Amycolatopsis* respectivamente. Por otra parte, la mayoría de los compuestos observados en estos grupos no se correspondía con los producidos más frecuentemente en las cepas de *Streptomyces*. Tampoco se pudo establecer ninguna relación directa entre ningún género y familias de compuestos, puesto que en muchas ocasiones, el mismo compuesto se detecta en taxones no relacionados, apoyando la amplia distribución de muchas de las rutas biosintéticas. Como hemos visto anteriormente, en el estudio de microfermentaciones de cepas de la familia *Pseudonocardiaceae*, sólo en una de las cepas de *Amycolatopsis* se detectaron compuestos conocidos y ningún compuesto conocido en las cepas de otros géneros como *Pseudonocardia*, *Actinomycetospira* o *Saccharothrix*, siendo por tanto las

frecuencias de detección de compuestos conocidos muy inferiores a los observados para estos géneros en el estudio de Genilloud y colaboradores, dejando la puerta abierta a nuevos estudios más detallados sobre el potencial metabólico y producción de nuevas moléculas por parte de este grupo de cepas aisladas líquenes.

Nuestros resultados plantean nuevas preguntas relacionadas con las limitaciones de las aproximaciones normalmente usadas para evaluar la diversidad microbiana y para explotar el enormemente rico potencial metabólico de las comunidades microbianas que habitan en líquenes tropicales. Sin ninguna duda, el uso de una estrategia que describa el perfil molecular metabólico ayudaría para describir aún más la diversidad de las cepas microbianas de un entorno determinado. Estudios adicionales serán necesarios para evaluar la implicación real de todos estos sistemas biosintéticos tan ampliamente distribuidos en la producción de compuestos bioactivos en el contexto de las relaciones microbianas establecidas en ambientes liquénicos.

_____ ***Conclusiones*** _____

1.- De todos los líquenes analizados se pudieron aislar diversas cepas de actinomicetos, sugiriendo que estos microorganismos forman parte habitualmente de la comunidad microbiana que habita los líquenes. El número de cepas de actinomicetos que pudieron aislarse de cada liquen varió notablemente en función del origen geográfico del mismo, siendo mucho más abundantes las poblaciones de actinomicetos cultivables aislados de líquenes de zonas tropicales que de zonas de clima frío.

2.- Los datos indican que distintas poblaciones de cepas de actinomicetos pueden recuperarse de líquenes recolectados en diferentes lugares geográficos y que, aunque muchas especies son cosmopolitas y pueden aislarse de diversos entornos y localizaciones, hay otras muchas cepas que son endémicas o al menos presentan algún patrón biogeográfico, pudiéndose aislar solamente de localizaciones únicas.

3.- El análisis de ácidos grasos ha permitido diferenciar los distintos grupos taxonómicos de actinomicetos y bien confirmar la identificación taxonómica de la cepas o bien asignar una primera identificación a cepas no clasificadas por su morfología o erróneamente asignadas a otros taxones debido a la dificultad de identificarlas únicamente en base a su morfología. Además, el análisis de ácidos grasos indica que la diversidad de las cepas estudiadas fue muy elevada, siendo una técnica con un poder de discriminación muy amplio que permite delimitar tanto los grandes grupos taxonómicos distinguir entre cepas estrechamente relacionadas.

4.- El análisis de la secuencia parcial del gen ribosomal 16S ADN_r, ha permitido en primer lugar, como en el caso del análisis de ácidos grasos, clasificar las cepas estudiadas, confirmando en la mayoría de los casos su identificación aunque en otros casos, permitiendo identificar cepas indeterminadas o erróneamente clasificadas según su morfología. También ha permitido estudiar la diversidad de las cepas aisladas así como establecer una correlación entre el origen de las cepas y la taxonomía de las mismas.

5.- La combinación de los datos aportados por el análisis de ácidos grasos y la secuenciación del gen ribosomal 16S ADN_r son de gran valor ya que permiten por un lado, identificar cepas indeterminadas o mal identificadas según su morfología, y por otro lado, estudiar la diversidad de las cepas a distintos niveles de resolución.

6.- Las técnicas de *fingerprinting* empleadas, especialmente las de rep-PCR, permiten analizar la diversidad de las cepas con un alto nivel de resolución, permitiendo distinguir entre cepas estrechamente relacionadas. En general, los métodos de rep-PCR han dado resultados con un gran poder de discriminación, aunque según el grupo taxonómico que se estudie, es preferible utilizar una técnica concreta. Así, para las cepas de la familia *Micromonosporaceae*, el método con mayor poder de discriminación fue ERIC-PCR, y REP-PCR para las cepas de la familia *Pseudonocardiaceae*, mientras que (GTG)₅-PCR fue el que mejor permite distinguir entre cepas del género *Streptomyces*.

7.- Mediante el empleo de la PCR con oligonucleótidos específicos para la detección de sistemas biosintéticos PKS-I, PKS-II, NRPS hemos podido determinar que estas rutas están ampliamente distribuidas en los grupos taxonómicos de actinomicetos estudiados, pero no así los sistemas APH y HMG CoA reductasa. La detección de sistemas PKS-II se observó en todos los grupos taxonómicos, así como las rutas de PKS-I salvo en ninguna

de las cepas de *Gordonia* y también las de NRPS salvo en la cepa de *Geodermatophilus* estudiada.

8.- El perfil de restricción de los productos amplificados con las parejas de oligonucleótidos específicas de sistemas PKS-I, PKS-II y NRPS permite caracterizar cada una de las cepas estudiadas, y puede ser utilizado como criterio de selección de cepas salvajes en base a su capacidad para sintetizar metabolitos secundarios.

9.- Un 27% de las cepas ensayadas produjo algún tipo de actividad antimicrobiana aunque las frecuencias de actividad fueron muy variables según el grupo taxonómico estudiado, siendo los géneros *Amycolatopsis* y *Streptomyces* los que presentaron mayor número de cepas activas, mientras que el número de cepas activas del género *Micromonospora* fue muy bajo.

10.- No ha podido establecerse una relación directa entre la detección de actividades antimicrobianas y la presencia de sistemas biosintéticos, observándose porcentajes similares de detección de rutas biosintéticas tanto en cepas activas como inactivas. Sin embargo, entre las cepas del género *Amycolatopsis* se observa tanto un elevado número de actividades antimicrobianas como de rutas biosintéticas. Por el contrario, contrasta el alto contenido de sistemas PKS-I, PKS-II y NRPS detectados en cepas salvajes de la familia *Micromonosporaceae* con el reducido número de actividades antimicrobianas detectadas en este grupo. Para las cepas del género *Streptomyces* la alta presencia de sistemas PKS-I, PKS-II y NRPS, no pudo correlacionarse claramente con la actividad antimicrobiana, encontrándose igualmente repartidas las cepas con alguna ruta entre las cepas activas e inactivas.

11.- Las cepas estudiadas de la familia *Pseudonocardiaceae* produjeron actividades antibacterianas y antifúngicas, detectándose sólo en una cepa la presencia de metabolitos secundarios conocidos por LC-MS. Aunque es de sobra conocida la producción de diversas moléculas bioactivas por cepas de la familia *Pseudonocardiaceae*, nuestros resultados muestran que es un grupo taxonómico que sigue presentando un gran potencial biosintético que debe ser estudiado con detenimiento como punto de partida para la síntesis de nuevos compuestos con aplicaciones biomédicas.

Bibliografía

Abd-El-Haleem, D., Layton, A. C. y Sayler, G. S. (2002). Long PCR-amplified rDNA for PCR-RFLP- and Rep-PCR-based approaches to recognize closely related microbial species. *Journal of Microbiological Methods*, **49**(3): 315-319.

Abel, K., Deschmertz, H. y Peterson, J. I. (1963). Classification of microorganisms by analysis of chemical composition. I. Feasibility of utilizing gas chromatography. *Journal of Bacteriology*, **85**: 1039-1044.

Acinas, S. G., Marcelino, L. A., Klepac-Ceraj, V., Polz, M. F. (2004). Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *Journal of Bacteriology*, **186**: 2629-2635.

Agate, A. D. y Bhat, J. V. (1963). A method for the preferential isolation of actinomycetes from soils. *Antonie van Leeuwenhoek*, **29**: 297-304.

Ahmadjian, V. (1993). The Lichen Symbiosis. John Wiley & Sons, New York, NY.

Alonso de la Vega, Pablo (2010). Distribución, caracterización e importancia ecológica de *Micromonospora* en nódulos fijadores de nitrógeno de *Lupinus*. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca. Departamento de Microbiología y Genética.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, **215**(3): 403-410.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaeffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.

Amann, R. I., Ludwig, W. y Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, **59**(1): 143-169.

Anderson, A. S. y Wellington, E. M. H. (2001). The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**(3): 797-814.

Anderson, A. S., Clark, D. J., Gibbons, P. H. y Sigmund, J. M. (2002). The detection of diverse aminoglycoside phosphotransferases within natural populations of actinomycetes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **29**(2): 60-69.

Anzai, Y., Okuda, T. y Watanabe, J. (1994). Application of the random amplified polymorphic DNA using the polymerase chain reaction for efficient elimination of duplicate strains in microbial screening. II. Actinomycetes. *Journal of Antibiotics*, **47**(2): 183-193.

Appuhamy, S., Parton, R., Coote, J. G. y Gibbs, H. A. (1997). Genomic fingerprinting of *Haemophilus somnus* by a combination of PCR methods. *Journal of Clinical Microbiology*, **35**(1): 288-291.

Arnez, J.G. y Moras, D. (1997). Structural and functional considerations of the aminoacylation reaction. *Trends in Biochemical Sciences*, **22**(6): 211-6.

Auch, A. F., Klenk, H. P. y Göker, M. (2010). Standard operating procedure for calculating genome-to-genome distances based on high-scoring segment pairs. *Standards in Genomic Sciences*, **2**, 142–148.

Ayuso, A. (2003). Herramientas moleculares para la detección de sistemas biosintéticos PKS-I, PKS-II y NRPS en actinomicetos. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.

Ayuso, A., Clark, D., Gonzalez, I., Salazar, O., Anderson, A. y Genilloud, O. (2005). A novel actinomycete strain de-replication approach based on the diversity of polyketide synthase and nonribosomal peptide synthetase biosynthetic pathways. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **67**(6): 795-806.

Ayuso-Sacido, A. y Genilloud, O. (2005). New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: Detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microbial Ecology*, **49**(1): 10-24.

Baas-Becking, L.G.M. (1934) *Geologie of Inleidning tot de Milieukunde* (W P Van Stokum, The Hague, The Netherlands).

Baele, M., Baele, P., Vaneechoutte, M., Storms, V., Butaye, P., Devriese, L. A., Verschraegen, G., Gillis, M. y Haesebrouck, F. (2000). Application of tRNA intergenic spacer PCR for identification of *Enterococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology*, **38**(11): 4201-4207.

Baines, A. L. D., Xiao, K. y Kinkel, L. L. (2007). Lack of correspondence between genetic and phenotypic groups amongst soil-borne streptomycetes. *FEMS Microbiology Ecology*, **59**(3), 564-575.

Balážová, T., Makovcová, J., Šedo, O., Slaný, M., Faldyna, M. y Zdráhal, Z. (2014). The influence of culture conditions on the identification of *Mycobacterium* species by MALDI-TOF MS profiling. *FEMS Microbiology Letters*, **353**(1):77-84.

Baldy-Chudzik, K., Niedbach, J. y Stosik, M. (2003). Rep-PCR fingerprinting as a tool for the analysis of genomic diversity in *Escherichia coli* strains isolated from an aqueous/freshwater environment. *Cellular and Molecular Biology Letters*, **8**(3): 793-798.

Barry, T., Colleran, G., Glennon, M., Dunican, L. K. y Gannon, F. (1991). The 16S/23S ribosomal spacer region as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR methods and Applications*, **1**: 51-56.

Basilio, A., Gonzalez, I., Vicente, M. F., Gorrochategui, J., Cabello, A., Gonzalez, A. y Genilloud, O. (2003). Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *Journal of Applied Microbiology*, **95**: 814-823.

Bates, S.T., Cropsey, G.W.G., Caporaso, J.G., Walters, W.A., Knight, R., y Fierer, N. (2010) Bacterial communities of lichens: structure and potential functions. *Botany 2010*. Stogran, J. (ed.). St. Louis, Missouri: Botanical Society of America.

Bates, S. T., Cropsey, G. W., Caporaso, J. G., Knight, R. y Fierer, N. (2011). Bacterial communities associated with the lichen symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**: 1309-14.

Bathe, S., Achouak, W., Hartmann, A., Heulin, T., Schlöter, M. y Leubhn, M. (2006). Genetic and phenotypic microdiversity of *Ochrobactrum* spp. *FEMS Microbiology Ecology*, **56**(2): 272-280.

Becker, B., Lechevalier, M. P. y Lechevalier, H. A. (1965). Chemical composition of cell-wall preparations from strains of various form-genera of aerobic actinomycetes. *Applied Microbiology*, **13**(2): 236-243.

Beijerinck, M. (1913) *De Infusies en de Ontdekking der Bacterien, Jaarboek van de Koninklijke Akademie v. Wetenschappen* (Muller, Amsterdam).

Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D. et al. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycetes *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, **417**: 141-147.

Bentley, D. R. (2006). Whole-genome re-sequencing. *Current Opinion in Genetics & Development*. **16**: 545-552.

Bérdy, J. (1995). Are actinomycetes exhausted as a source of secondary metabolites? *Biotehnologija. Proceedings 9th International Symposium on the Biology of Actinomycetes*, pp. 13–34. Moscow 1994. Ed. Debanov VG.

Bérdy, J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *Journal of Antibiotics*, **58**(1): 1-26

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2012). Second Edition. Volume Five: The *Actinobacteria*, Part A. Editado por Michael Goodfellow, Peter Kämpfer, Hans-Jürgen Busse, Martha E. Trujillo, Ken-ichiro Suzuki, Wolfgang Ludwig y William B. Whitman. Springer.

Bibb, M. J. (2005). Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current Opinion in Microbiology*. **8**: 208-215.

Bills, G. F., Platas, G., Fillola, A. Jimenez, M. R., Collado, J., Vicente, F., Martin, J., Gonzalez, A., Bur-Zimmermann, J., Tormo, J. R. y Pelaez, F. (2008). Enhancement of antibiotic and secondary metabolite detection from filamentous fungi by growth on nutritional arrays. *Journal of Applied Microbiology*, **104**: 1644-58.

Blanc, D. S., Hauser, P. M., Francioli, P. y Bille, J. (1998). Molecular typing methods and their discriminatory power. *Clinical Microbiology and Infection*, **4**(2): 61-63.

- Blanco, G., Brian, P., Pereda, A., Méndez, C., Salas, J. A. y Chater, K. F. (1993).** Hybridization and DNA sequence analyses suggest an early evolutionary divergence of related biosynthetic gene sets encoding polyketide antibiotics and spore pigments in *Streptomyces* spp. *Gene*, **130**: 107-116.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Keyzers, R. A., Munro, M. H. G. y Prinsep, M. R. (2014).** Marine natural products. *Natural Product Reports*, The Royal Society of Chemistry. **31**(2): 160-258.
- Bode, H. B., Bethe, B., Hofs, R. y Zeeck, A. (2002).** Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chembiochem*. **3**: 619-27.
- Boenigk, J., Pfandl, K., Garstecki, T., Harms, H., Novarino, G. y Chatzinotas, A. (2006).** Evidence for geographic isolation and signs of endemism within a protistan morphospecies. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**(8): 5159-5164.
- Boustie, J. y Grube, M. (2005).** Lichens - a promising source of bioactive secondary metabolites. *Plant Genetic Resources Characterization and Utilization*, **3** (2): 273-287.
- Boustie, J., Tomasi, S. y Grube, M. (2011).** Bioactive lichen metabolites: alpine habitats as an untapped source. *Phytochemistry Reviews*, **10**: 287-307.
- Bowers, J. H., Kinkel, L. L. y Jones, R. K. (1996).** Influence of disease-suppressive strains of *Streptomyces* on the native *Streptomyces* community in soil as determined by the analysis of cellular fatty acids. *Canadian Journal of Microbiology*, **42**(1): 27-37.
- Boyer, S. L., Flechtner, V. R. y Johansen, J. R. (2001).** Is the 16S-23S rRNA internal transcribed spacer region a good tool for use in molecular systematics and population genetics? A case study in *Cyanobacteria*. *Molecular Biology and Evolution*, **18**: 1057-1069.
- Brambilla, E., Hippe, H., Hagelstein, A., Tindall, B. J. and Stackebrandt, E. (2001).** 16S rDNA diversity of cultured and uncultured prokaryotes of a mat sample from Lake Fryxell, McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Extremophiles*. **5**(1): 23-33.
- Brandao, P. F., Clapp, J. P. y Bull, A.T. (2002).** Discrimination and taxonomy of geographically diverse strains of nitrile-metabolizing actinomycetes using chemometric and molecular sequencing techniques. *Environmental Microbiology*, **4**(5): 262-76.
- Bright, J. J., Claydon, M. A., Soufian, M., Gordon, D. B. (2002).** Rapid typing of bacteria using matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry and pattern recognition software. *Journal of Microbiological Methods* **48**: 127–138.
- Buckley, D. y Schmidt, T., (2002)** "Biodiversity of Microbial Life". Editado por Staley, J. y Reysenbach, A. Wiley, NY. pp. 183-208.
- Bull, A. T., Goodfellow, M. y Slater, J. H. (1992).** Biodiversity as a source of innovation in biotechnology. *Annual Review of Microbiology*, **46**: 219-252.

Bull, A. T., Ward, A. C. y Goodfellow, M. (2000). Search and discovery strategies for biotechnology: The paradigm shift. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **64** (3): 573-606.

Bull, A. T. (2004). Microbial Diversity and Bioprospecting. Editado por Alan T. Bull. ASM Press. Washington, DC.

Burucoa, C., Lhomme, V. y Fauchere, J. L. (1999). Performance criteria of DNA fingerprinting methods for typing of *Helicobacter pylori* isolates: Experimental results and meta-analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**(12): 4071-4080.

Bush, M. J., Bibb, M. J., Chandra, G., Findlay, K. C., Buttner, M. J. (2013). Genes Required for Aerial Growth, Cell Division, and Chromosome Segregation Are Targets of WhiA before Sporulation in *Streptomyces venezuelae*. *MBio*. **4**(5).

Busti, E., Monciardini, P., Cavaletti, L., Bamonte, R., Lazzarini, A., Sosio, M. y Donadio, S. (2006). Antibiotic-producing ability by representatives of a newly discovered lineage of actinomycetes. *Microbiology*, **152**: 675-683.

Cannell, R. J. P. How to approach the isolation of a natural product. En *Methods in Biotechnology*, Vol. 4: Natural Products Isolation. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, USA. 1998.

Cardinale, M., Puglia, A. M. y Grube, M. (2006). Molecular analysis of lichen-associated bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, **57**(3): 484-495.

Cardinale, M., Vieira de Castro, J., Müller, H., Berg, G. y Grube, M. (2008). *In situ* analysis of the bacterial community associated with the reindeer lichen *Cladonia arbuscula* reveals predominance of Alphaproteobacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, **66**(1): 63-71.

Cardinale, M., Steinová, J., Rabensteiner, J., Berg, G. y Grube, M. (2012a). Age, sun and substrate: triggers of bacterial communities in lichens. *Environmental Microbiology Reports*, **4**: 23-28.

Cardinale, M., Grube, M., de Castro Jr, J. V., Müller, H. y Berg, G. (2012b). Bacterial taxa associated with the lung lichen *Lobaria pulmonaria* are differentially shaped by geography and habitat. *FEMS Microbiology Letters*, **329**: 111-115.

Carro, L., Pukall, R., Spröer, C., Kroppenstedt, R. M., Trujillo, M. E. (2012). *Micromonospora cremea* sp. nov. and *Micromonospora zamorensis* sp. nov., isolated from the rhizosphere of *Pisum sativum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **62**: 2971-2977.

Carro-Garcia, L., Martínez-Molina, E., Trujillo, M. E. (2010). *Micromonospora pisi* sp. nov., isolated from root nodules of *Pisum sativum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **60**: 331-337.

Cartledge, J. D., Midgley, J. y Gazzard, B. G. (1997). Clinically significant azole cross-resistance in *Candida* isolates from HIV-positive patients with oral candidosis. *AIDS*, **11**(15): 1839-1844.

Castenholz, R. W. (1996). Endemism and biodiversity of thermophilic cyanobacteria. *Nova Hedwigia Beihefte*, **112**: 33–47.

Caudales, R., Wells, J. M. y Butterfield, J. E. (2000). Cellular fatty acid composition of cyanobacteria assigned to subsection II, order *Pleurocapsales*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **50**: 1029-1034.

Chater K. F., Merrick M. J. (1979). Streptomycetes. En *Developmental biology of prokaryotes*, pp. 93–114. Editado por Parish J. H. (Blackwell, Oxford, England).

Cheenpracha, S., Vidor, N. B., Yoshida, W. Y., Davies, J. y Chang, L. C. (2010). Coumabiocins A-F, aminocoumarins from an organic extract of *Streptomyces* sp. L-4-4. *Journal of Natural Products*, **73**: 880-4.

Cho, J. C., y J. M. Tiedje. (2000). Biogeography and degree of endemism of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(12): 5448–5456.

Chun, J., Lee, J. H., Jung, Y., Kim, M., Kim, S., Kim, B. K. y Lim, Y. W. (2007). EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **57**: 2259-2261.

Chun, J. y Rainey, F. A. (2014). Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **64**: 316-324.

Clardy, J., Fischbach, M. A. y Walsh, C. T. (2006). New antibiotics from bacterial natural products. *Nature Biotechnology*, **24**: 1541-1550.

Clark, A. M. (1996). Natural products as a resource for new drugs. *Pharmaceutical Research*, **13**: 1133-1141.

Claydon, M. A., Davey, S. N., Edwards-Jones, V. y Gordon, D. B. (1996). The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nature Biotechnology*, **14**(11): 1584-1586.

Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell, D. M., Marsh, T., Garrity, G. M., Tiedje, J. M. (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Research*, **37**, D141–D145.

Collins, M., Keddle, R. y Kroppenstedt, R. (1983). Lipid composition of *Arthrobacter simplex*, *Arthrobacter tumescens* and possibly related taxa. *Systematic and Applied Microbiology*, **4**(1): 18-26.

Colwell, R. R. (1970). Polyphasic taxonomy of bacteria. En *Culture Collections of Microorganisms*, pp. 421-436. Editado por H. I. T. Hasegawa. University Park Press. Baltimore.

Colwell, R. R., Clayton, R. A., Ortiz-Conde, B. A., Jacobs, D. y Russek-Cohen, E. (1995). The microbial species concept and biodiversity. En *Microbial diversity and ecosystem function*, pp. 3-15. Editado por D. Allsopp, R. R. Colwell y D. L. Hawksworth. Oxon, United Kingdom. CAB International.

Cooley, W. W. y Lohnes, P. R. (1971). Multivariate data analysis. Wiley, New York.

Courtois S., Cappellano C. M., Ball M., Francou F. X., Normand P., Helynck G., Martinez A., Kolvek S. J., Hopke J., Osburne M. S., August P. R., Nalin R., Guerineau M., Jeannin P., Simonet P. y Pernodet J. L. (2003) Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**:49–55

Cox, P. A., S. A. Banack, Murch, S. J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R. R., Metcalf, J. S., Morrison, L. F., Codd, G. A., Bergman, B. (2005). Diverse taxa of cyanobacteria produce beta-N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**: 5074-5078.

Crittenden, P. D. y Porter, N. (1991). Lichen-forming fungi: potential sources of novel metabolites. *Trends in Biotechnology*, **9**(12): 409-414.

Davelos, A. L., Xiao, K., Flor, J. M. y Kinkel, L. L. (2004a). Genetic and phenotypic traits of streptomycetes used to characterize antibiotic activities of field-collected microbes. *Canadian Journal of Microbiology*, **50**(2): 79-89.

Davelos, A. L., Kinkel, L. L. y Samac, D. A. (2004b). Spatial variation in frequency and intensity of antibiotic interactions among Streptomycetes from prairie soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**: 1051-1058.

Davelos, A. L., Xiao, K., Samac, D. A., Martin, A. P. y Kinkel, L. L. (2004c). Spatial variation in *Streptomyces* genetic composition and diversity in a prairie soil. *Microbial Ecology*, **48**: 601-612.

Davies, J. (1990). What are antibiotics? Archaic functions for modern activities. *Molecular Microbiology*, **4**(2): 1227-1232.

Davies, J., Wang, H., Taylor, T., Warabi, K., Huang, X. H. y Andersen, R. J. (2005). Uncialamycin, a new enediyne antibiotic. *Organic Letters*, **7**: 5233-5236.

Davies, J. y Ryan, K. S. (2011). Introducing the Parvome: Bioactive Compounds in the Microbial World. ACS chemical biology.

Davies, J. (2014). The Origin and Evolution of Antibiotics. En *Antimicrobials*. pp. 3-10. Editado por Marinelli, F. y Genilloud, O. Springer Berlin Heidelberg.

Dawson, S. L., Fry, J. C. y Dancer, B. N. (2002). A comparative evaluation of five typing techniques for determining the diversity of fluorescent pseudomonads. *Journal of Microbiological Methods*, **50**(1): 9-22.

de los Rios, A., Wierzechos, J. y Ascaso, C. (2002). Microhabitats and chemical microenvironments under saxicolous lichens growing on granite. *Microbial Ecology*, **43**: 181-188.

de la Torre, J. R., Goebel, B. M., Friedmann, E. I. and Pace, N. R. (2003). Microbial diversity of cryptoendolithic communities from the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 3858–3867.

De Bruijn, F. J. (1992). Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain-reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **58**(7): 2180-2187.

De Bruijn, F.J., Schneider, M., Rossbach, U., Louws, F.J., (1996a). Automated Fluorescent and Conventional rep-PCR Genomic Fingerprinting and Multiplex PCR to Classify Bacteria and Track Genes. En *Proceedings of the 7th International Symposium on Microbial Ecology*, Santos, Brasil.

De Bruijn, F.J., Rademaker, J.L., Schneider, M., Rossbach, U., Louws, F.J., (1996b). Rep-PCR Genomic Fingerprinting of Plant-Associated Bacteria and Computer-Assisted Phylogenetic Analysis. En *Proceedings of the 8th International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions*, 497-502. Editado por Stacy, G., Mullin, B., Gresshoff, P. St.Paul, MN: APS Press.

De Ley, J., Segers, P., Kersters, K., Mannheim, W. y Lievens, A. (1986). Intra- and Intergeneric Similarities of the *Bordetella* Ribosomal Ribonucleic Acid Cistrons: Proposal for a New Family, *Alcaligenaceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **36**(3): 405-414.

Deloger, M., El Karoui, M. y Petit, M. A. (2009). A genomic distance based on MUM indicates discontinuity between most bacterial species and genera. *Journal of Bacteriology*, **191**, 91–99.

Demain, A. L. (1998). Induction of microbial secondary metabolism. *International Microbiology*, **1**: 259-264.

Demain, A. L. (1999). Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, pp. 455-463.

Demain, A. L. (2004). Foreword (ppxiii-xiv). En *Microbial Diversity and Bioprospecting*. Editado por Alan T. Bull. ASM Press. Washington, DC.

Demain, A. L. (2006). From natural products discovery to commercialization: a success story. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, pp. 486-495.

Demain, A. L. y Adrio, J. (2008). Contributions of microorganisms to industrial biology. *Molecular Biotechnology*, pp. 41-55.

Demain, A. L. (2009). Antibiotics: Natural products essential to human health. *Medicinal Research Reviews*, pp. 821-842.

Demain, A. L. y Sanchez, S. (2009). Microbial drug discovery: 80 years of progress. *Journal of Antibiotics*, **62**(1): 5-16.

Dewedar, A., Mourad, F. E. y Sheha, H. (1979). *Thermomonospora* sp. T-SA-125 and its production of a growth promoting antibiotic. *Folia Microbiologica*, **24**(5): 396-402.

De Wit, R. y T. Bouvier (2006). 'Everything is everywhere, but, the environment selects'; what did Baas Becking and Beijerinck really say? *Environmental Microbiology*, Blackwell Publishing Ltd. **8**: 755-758.

Dice, L. R. (1945). Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, **26** (3): 297-302.

Dieckmann, R., Graeber, I., Kaesler, I. Szewzyk, U., y von Dohren, H. (2005). Rapid screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the Sula Ridge by Intact-Cell-MALDI-TOF mass spectrometry (ICM-MS). *Applied Microbiology and Biotechnology*, **67**: 539-548.

Dijkshoorn, L., Towner, K. J. y Struelens, M. (2001). New approaches for the generation and analysis of microbial typing data. Editado por L. Dijkshoorn, K. J. Towner and M. Struelens. Elsevier Science. Amsterdam, Holanda.

Doll, L., Moshitch, S. y Frankel, G. (1993). Poly(GTG)₅-associated profiles of *Salmonella* and *Shigella* genomic DNA. *Research in Microbiology*, **144**(1): 17-24.

Donadio, S., Sosio, M. y Lancini, G. (2002a). Impact of the first *Streptomyces* genome sequence on the discovery and production of bioactive substances. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **60**: 377-380.

Donadio, S., Monciardini, P., Alduina, R., Mazza, P., Chiocchini, C., Cavaletti, L., Sosio, M. y Puglia, A. M. (2002b). Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. *Journal of Biotechnology*, **99**: 187-198.

Donadio, S., Busti, E., Monciardini, P., Bamonte, R., Mazza, P., Sosio, M. y Cavaletti, L. (2005). Sources of Polyketides and Non-Ribosomal Peptides. *Biocombinatorial Approaches for Drug Finding*: 19-41.

Donadio, S., Monciardini, P. y Sosio, M. (2007). Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. *Natural Product Reports*, **24**: 1073-1109.

Drucker, D. B. y Norris, J. R. (1976). Chapter III. Gas-Liquid Chromatographic Chemotaxonomy. En *Methods in Microbiology*, pp. 51-125. Editado por J. R. R. Norris, Douglas W. Academic Press, Inc. London.

Duetz, W. A., Ruedi, L., Hermann, R., O'Connor, K., Buchs, J. y Witholt, B. (2000). Methods for intense aeration, growth, storage, and replication of bacterial strains in microtiter plates. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(6): 2641-2646.

Duetz, W. A. (2007). Microtiter plates as mini-bioreactors: miniaturization of fermentation methods. *Trends in Microbiology*, **15**(10): 469-475.

Dunn, W. B., Bailey, N. J. C. y Johnson, H. E. (2005). Measuring the metabolome: current analytical technologies. *Analyst*, **130**: 606-625.

Dunn, W. B. y Ellis, D. I. (2005). Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *Trends in Analytical Chemistry*, **24**: 285-294.

Dykhuizen, D. E. (1998). Santa Rosalia revisited: why are there so many species of bacteria? *Antonie van Leeuwenhoek*, **73**: 25-33.

Eardly, B. D., L. A. Materon, N. H. Smith, D. A. Johnson, M. D. Rumbaugh, y R. K. Selander. (1990). Genetic structure of natural populations of the nitrogen-fixing bacterium *Rhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**: 187-194.

Edlund, A., Loesgen, S., Fenical, W. y Jensen, P. R. (2011). Geographic distribution of secondary metabolite genes in the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**(17): 5916-5925.

Edwards, A. W., Cavalli-Sforza, L. L. (1965). A method for cluster analysis. *Biometrics*, **21**: 362-75.

Ehrenstein, B., Bernards, A. T., Dijkshoorn, L., GernerSmidt, P., Towner, K. J., Bouvet, P. J. M., Daschner, F. D. y Grundmann, H. (1996). *Acinetobacter* species identification by using tRNA spacer fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*, **34**(10): 2414-2420.

Embley, T. M. (1992). The family *Pseudonocardiaceae*. En *The Prokaryotes*, pp. 996-1027. Editado por A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, H. Harder y K. H. Schleifer. Springer. New York, NY.

Embley, T. M. y Stackebrandt, E. (1994). The Molecular Phylogeny and Systematics of the Actinomycetes. *Annual Review of Microbiology*, pp. 257-289.

Embley, T. M. y Wait, R. (1994). Structural lipids of eubacteria. En *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*, pp. 121-161. Editado por M. Goodfellow, A. G. O'Donnell. John Wiley and Sons Ltd., Chichester.

Escobar-Páramo, P., S. Ghosh, y J. DiRuggiero. (2005). Evidence for genetic drift in the diversification of a geographically isolated population of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus*. *Molecular Biology and Evolution*, **22**: 2297–2303.

Felsenstein, J. (1973). Maximum-likelihood estimation of evolutionary trees from continuous characters. *American Journal of Human Genetics*, pp. 471-492.

Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, **17**: 368-376.

Fenical, W. (1993). Chemical Studies of Marine Bacteria: Developing a New Resource. *Chem. Rev.* **93**: 1673-1683.

Fenselau, C., Demirev, P. A. (2001). Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev.*, **20**(4):157-171.

Fiedler, H. P. (1984). Screening for new microbial products by high-performance liquid-chromatography using a photodiode array detector. *Journal of Chromatography*, pp. 487-494.

Fiedler, H. P., Bruntner, C., Bull, A. T., Ward, A. C., Goodfellow, M., Potterat, O., Puder, C. y Mihm, G. (2005). Marine actinomycetes as a source of novel secondary metabolites. *Antonie van Leeuwenhoek*, **87**: 37-42.

Fierer, N. y Jackson, R. B. (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**(3): 626-631.

Finlay, B. J. (2002). Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science*, **296**: 1061-1063.

Fischer, A., Kroppenstedt, R. M. y Stackebrandt, E. (1983). Molecular-genetic and chemotaxonomic studies on *Actinomadure* and *Nocardiopsis*. *Journal of General Microbiology*, **129**: 3433-3446.

Foti, M., Ma, S., Sorokin, D. Y., Rademaker, J. L. W., Kuenen, J. G. y Muyzer, G. (2006). Genetic diversity and biogeography of haloalkaliphilic sulphur-oxidizing bacteria belonging to the genus *Thioalkalivibrio*. *FEMS Microbiology Ecology*, **56**(1): 95-101.

Fox, G. E., Pechman, K. R. y Woese, C. R. (1977). Comparative cataloging of 16S ribosomal ribonucleic acid: molecular approach to procaryotic systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **27**, 44-57.

Fox, G. E., Stackebrandt, E., Hespell, R. B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T. A., Wolfe, R. S., Balch, W. E., Tanner, R. S., Magrum, L. J., Zablen, L. B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonen, L., Lewis, B. J., Stahl, D. A., Luehrsen, K. R., Chen, K. N. y Woese, C. R. (1980). The phylogeny of prokaryotes. *Science*, pp. 457-463.

Fox, G. E. y Stackebrandt, E. (1987). The application of 16S ribosomal-RNA cataloging and 5S ribosomal-RNA sequencing in bacterial systematics. *Methods in Microbiology*, pp. 405-458.

Fox, G. E., Wisotzkey, J. D. y Jurtshuk, P. (1992). How close is close - 16S ribosomal-RNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **42**(1): 166-170.

Frisvad, J. C. y Thrane, U. (1987). Standardized high-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone retention indices and UV-VIS spectra (diode array detection). *Journal of Chromatography*, **404**(1): 195-214.

Fulthorpe, R. R., A. N. Rhodes y J. M. Tiedje. (1998). High levels of endemicity of 3-chlorobenzoate-degrading soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**:1620–1627.

Garcia-Martinez, J., Acinas, S. G., Anton, A. I. y Rodriguez-Valera, F. (1999). Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity. *Journal of Microbiological Methods*, **36**(1-2): 55-64.

Garcia-Pichel, F., L. Prufert-Bebout y G. Muyzer. (1996). Phenotypic and phylogenetic analyses show *Microcoleus chthonoplastes* to be a cosmopolitan cyanobacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**: 3284–3291.

Garrity, G. M., Heimbuch, B. K. y Gagliardi, M. (1996). Isolation of zoosporogenous actinomycetes from desert soils. *Journal of Industrial Microbiology*, **17**: 260-267.

Genilloud, O., González, I., Salazar, O., Martín, J., Tormo, J. y Vicente, F. (2011). Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **38**: 375-389.

Genilloud, O. y Vicente, F. (2012). Drug Discovery from Natural Products. Editado por Genilloud, O. y Vicente, F. Royal Society of Chemistry.

Genilloud, O. y Vicente, F. (2014). Strategies to Discover Novel Antimicrobials to Cope with Emerging Medical Needs. pp. 327-360. En *Antimicrobials*. Editado por Marinelli, F. y Genilloud, O. Springer Berlin Heidelberg.

Gevers, D., Huys, G. y Swings, J. (2001). Applicability of rep-PCR fingerprinting for identification of *Lactobacillus* species. *FEMS Microbiology Letters*, **205**(1): 31-36.

Gevers, D., Cohan, F. M., Lawrence, J. G., Spratt, B. G., Coenye, T., Feil, E. J., Stackebrandt, E., Van de Peer, Y., Vandamme, P., Thompson, F. L., Swings, J. (2005). Opinion: Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology*, **3**: 733-9.

Geysen, H.M., Schoenen, F., Wagner, D. and Wagner, R. (2003). Combinatorial compound libraries for drug discovery: an ongoing challenge. *Nature Reviews Drug Discovery*, **2**: 222-230.

Gillings, M. y Holley, M. (1997). Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. *Letters in Applied Microbiology*, pp. 17-21.

Gilson, E., Clement, J. M., Brutlag, D. y Hofnung, M. (1984). A family of dispersed repetitive extragenic palindromic DNA-sequences in *Escherichia coli*. *EMBO Journal*, **3**(6): 1417-1421.

Gilson, E., Rousset, J. P., Clement, J. M. y Hofnung, M. (1986). A subfamily of *Escherichia coli* palindromic units implicated in transcription termination. *Annales De L Institut Pasteur-Microbiologie*, **137B**(3): 259-270.

Gilson, E., Perrin, D., Saurin, W. y Hofnung, M. (1987). Species specificity of bacterial palindromic units. *Journal of Molecular Evolution*, **25**(4): 371-373.

Giovannoni, S. J. (1991). The Polymerase Chain Reaction. En *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 177-203. Editado por E. S. M. Goodfellow. John Wiley & Sons, Ltd.

Glucksman, A. M., Skipper, H. D., Brigmon, R. L. y Santo Domingo, J. W. (2000). Use of the MIDI-FAME technique to characterize groundwater communities. *Journal of Applied Microbiology*, **88**(4): 711-719.

Gontang, E. A., Gaudencio, S. P., Fenical, W. y Jensen, P. R. (2010). Sequence-Based Analysis of Secondary-Metabolite Biosynthesis in Marine Actinobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**(8): 2487-2499.

Gonzalez, I., Ayuso-Sacido, A., Anderson, A. y Genilloud, O. (2005). Actinomycetes isolated from lichens: Evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiology Ecology*, pp. 401-415.

Goodacre, R., Timmins, A. M., Burton, R., Kaderbhai, N., Woodward, A. M., Kell, D. B. y Rooney, P. J. (1998). Rapid identification of urinary tract infection bacteria using hyperspectral whole-organism fingerprinting and artificial neural networks. *Microbiology*, **144**(5): 1157-1170.

Goodfellow, M. y Haynes, J. A. (1984). Actinomycetes in marine sediments. En *Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes*, pp. 453-472. Editado por I. Ortiz-Ortiz, Bojalil, L. F. and Yakoleff, V. Academic Press. London

Goodfellow, M. y Minnikin, D. E. (1985). Chemical Methods in Bacterial Systematics. London, United Kingdom. Academic Press.

Goodfellow, M. y Williams, E. (1986). New strategies for the selective isolation of industrially important bacteria. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, **4**: 213-262.

Goodfellow, M., Lacey, J., Athalye, M., Embley, T. M. y Bowen, T. (1989). *Saccharopolyspora gregorii* and *Saccharopolyspora hordei*: two new actinomycete species from fodder. *Journal of General Microbiology*, **135**(8): 2125-2139.

Goodfellow, M., Stanton, L. J., Simpson, K. E. y Minnikin, D. E. (1990). Numerical and chemical classification of *Actinoplanes* and some related actinomycetes. *Journal of General Microbiology*, **136**(1): 19-36.

Goodfellow, M., Ferguson, E. V. y Sanglier, J. J. (1992). Numerical classification and identification of *Streptomyces* species - A review. *Gene*, **115**: 225-233.

Goodfellow, M. (1995). Towards minimal standards for the description of *Streptomyces* species. *Proceedings of the 9th Symposium of the Actinomycetes*.

Goodfellow, M., Freeman R y PR., S. (1997a). Curie-point pyrolysis mass spectrometry as a tool in clinical microbiology. *Zentralbl Bakteriol*, **285**: 133-156.

Goodfellow, M., Manfio, G. P. y Chu, J. (1997b). Towards a practical species concept for cultivable bacteria. En *Species: The Units of Biodiversity*, pp. 25-60. Editado por A. D. a. M. W. MF Claridge. London, United Kingdom. Chapman & Hall.

Goris, J., Konstantinidis, K. T., Klappenbach, J. A., Coenye, T., Vandamme, P., Tiedje, J. M. (2007). DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **57**: 81-91.

Gräfe, U. (1988). Autoregulatory secondary metabolism in actinomycetes. En *Regulation of secondary metabolism in actinomycetes*, pp. 75-126. Editado por S. Shapiro. CRC Press, Inc. (Florida).

Green, J. y Bohannan, B. J. M. (2006). Spatial scaling of microbial biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution*, **21**(9): 501-507.

Grube, M. y Berg, G. (2009). Microbial consortia of bacteria and fungi with focus on the lichen symbiosis. *Fungal Biology Reviews*, **23**: 72-85.

Grube, M., Cardinale, M., de Castro, J. V., Jr., Mueller, H. & Berg, G. (2009). Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbioses. *ISME Journal*. International Society for Microbial Ecology, **3**: 1105-1115.

Guckert, J. B., Ringelberg, D. B., White, D. C., Hanson, R. S. y Bratina, B. J. (1991). Membrane fatty-acids as phenotypic markers in the polyphasic taxonomy of methylotrophs within the *Proteobacteria*. *Journal of General Microbiology*, **137**: 2631-2641.

Guerrero, R., Urmeneta, J. y Rampone, G. (1993). Distribution of types of microbial mats at the Ebro Delta, Spain. *Biosystems*. 31(2-3): 135-144.

Guo, Y., W. Zheng, Rong, X., Huang, Y. (2008). A multilocus phylogeny of the *Streptomyces griseus* 16S rRNA gene clade: use of multilocus sequence analysis for streptomycete systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **58**: 149-59.

Gürtler, V. y Stanisich, V. A. (1996). New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology*, **142**(1): 3-16.

Hain, T., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R. M., Stackebrandt, E. y Rainey, F. A. (1997). Discrimination of *Streptomyces albidoflavus* strains based on the size and number of 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **47**(1): 202-206.

Hane, B. G., Jager, K. y Drexler, H. G. (1993). The Pearson product-moment correlation-coefficient is better suited for identification of DNA fingerprint profiles than band matching algorithms. *Electrophoresis*, **14**(10): 967-972.

Harper, J. L. y Hawksworth, D. L. (1995). Biodiversity: measurement and estimation. En *Biodiversity: measurement and estimation*. Editado por D. L. Hawksworth. London, United Kingdom. Chapman & Hall.

Hayakawa, M. y Nonomura, H. (1987a). Humic-acid vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *Journal of Fermentation Technology*, **65**(5): 501-509.

Hayakawa, M. y Nonomura, H. (1987b). Efficacy of artificial humic-acid as a selective nutrient in hv agar used for the isolation of soil actinomycetes. *Journal of Fermentation Technology*, **65**(6): 609-616.

Hayakawa, M. y Nonomura, H. (1989). A New Method for the Intensive Isolation of Actinomycetes from Soil. *Actinomycetologica*, **3**(2): 95-104.

Hayakawa, M., Sadakata, T., Kajiura, T. y Nonomura, H. (1991a). New methods for the highly selective isolation of *Micromonospora* and *Microbispora* from soil. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **72**(5): 320-326.

Hayakawa, M., Kajiura, T. y Nonomura, H. (1991b). New methods for the highly selective isolation of *Streptosporangium* and *Dactylosporangium* from soil. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **72**(5): 327-333.

Hayakawa, M., Tamura, T. y Nonomura, H. (1991c). Selective isolation of *Actinoplanes* and *Dactylosporangium* from soil by using gamma-collidine as the chemoattractant. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **72**(6): 426-432.

Hayakawa, M., Otaguro, M., Takeuchi, T., Yamazaki, T. y Iimura, Y. (2000). Application of a method incorporating differential centrifugation for selective isolation of motile actinomycetes in soil and plant litter. *Antonie van Leeuwenhoek*, **78**(2): 171-185.

Henkel, T., Brunne, R. M., Müller, H. y Reichel, F. (1999). Statistical investigation into the structural complementarity of natural products and synthetic compounds. *Angewandte Chemie International Edition*, **38**: 643-647

Henz, S. R., Huson, D. H., Auch, A. F., Nieselt-Struwe, K. y Schuster, S. C. (2005). Whole-genome prokaryotic phylogeny. *Bioinformatics*, **21**, 2329–2335.

Herron, P. R. y Wellington, E. M. H. (1990). New method for extraction of streptomycete spores from soil and application to the study of lysogeny in sterile amended and nonsterile soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **56**(5): 1406-1412.

Hey, J. (2001). The mind of the species problem. *Trends in Ecology and Evolution*, **16**(7): 326-329.

Heyndrickx, M., Vauterin, L., Vandamme, P., Kersters, K. y DeVos, P. (1996). Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *Journal of Microbiological Methods*, **26**(3): 247-259.

Heyrman, J., Mergaert, J., Denys, R. y Swings, J. (1999). The use of fatty acid methyl ester analysis (FAME) for the identification of heterotrophic bacteria present on three mural paintings showing severe damage by microorganisms. *FEMS Microbiology Letters*, **181**(1): 55-62.

Higgs, R. E., Zahn, J. A., Gygi, J. D. y Hilton, M. D. (2001). Rapid method to estimate the presence of secondary metabolites in microbial extracts. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 371-376.

Hill, T. C. J., Walsh, K. A., Harris, J. A. y Moffett, B. F. (2003). Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, **43**(1): 1-11.

Hillis, D. M. y Dixon, M. T. (1991). Ribosomal DNA: Molecular Evolution and Phylogenetic Inference. *The Quarterly Review of Biology*, **66**(4): 411-453.

Hirsch, C. F. et al. (1988). Antifungal fermentation product and method. *US Pat. No. 4.946.835*, Merck & Co.

Hirsch, C. F. y Sigmund, J. M. (1995). Use of polymerase chain-reaction (PCR) fingerprinting to differentiate bacteria for microbial products screening. *Journal of Industrial Microbiology*, **15**(2): 85-93.

- Hirsch, P., Mevs, U., Kroppenstedt, R.M., Schumann, P. and Stackebrandt, E. (2004)** Cryptopendolithic actinomycetes from antarctic sandstone: *Micromonospora endolithica* sp. nov. and two isolates related to *Micromonospora coerulea* Jensen 1932. *Systematic and Applied Microbiology*, **27**: 166–174
- Hitzeroth, G., Vater, J., Franke, P., Gebhardt, K. y Fiedler, H. P. (2005).** Whole cell matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry and in situ structure analysis of streptocidins, a family of tyrocidine-like cyclic peptides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **19**: 2935-2942.
- Hodges, T., Slaterry, M. y Olson, J. (2012).** Unique Actinomycetes from Marine Caves and Coral Reef Sediments Provide Novel PKS and NRPS Biosynthetic Gene Clusters. *Marine Biotechnology*, **14**: 270-280.
- Hodkinson, B. P., Gottel, N. R., Schadt, C. W. y Lutzoni, F. (2012).** Photoautotrophic symbiont and geography are major factors affecting highly structured and diverse bacterial communities in the lichen microbiome. *Environmental Microbiology*, **14**: 147-161.
- Holloway, B. W., Krishnapillai, V. y Morgan, A. F. (1979).** Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiological Reviews*. 43: 73-102.
- Holmalahti, J., Von Wright, A. y Raatikainen, O. (1994).** Variations in the spectra of biological activities of actinomycetes isolated from different soils. *Letters in Applied Microbiology*, **18**: 144-146.
- Hope, K. (1968).** Methods of Multivariate Analysis. University of London Press, London.
- Hopwood, D.A. (1997).** Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chemical Reviews*, **97**: 2465-2497.
- Hopwood, D. (2003).** *Streptomyces* genes: from Waksman to Sanger. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **30**(8): 468-471.
- Horan, A.C. (1999).** Secondary metabolite production, actinomycetes, other than *Streptomyces*. En *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*, pp. 2333–2348. Editado por Flickinger, M.C. y Drew, S.W. Wiley, New York, NY.
- Hou, Y., Braun, D. R., Michel, C. R., Klassen, J. L., Adnani, N., Wyche, T. P. y Bugni, T. S. (2012).** Microbial Strain Prioritization Using Metabolomics Tools for the Discovery of Natural Products. *Analytical Chemistry*, **84**: 4277-4283.
- Hsueh, P. R., Lee, T. F., Du, S. H., Teng, S. H., Liao, C.H., Sheng, W. H. y Teng, L. J. (2014).** Bruker biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Kocuria*, *Gordonia*, *Tsukamurella*, and *Listeria* species. *Journal of Clinical Microbiology*, **52**(7):2371-2379.

Huddleston, A. S., Cresswell, N., Neves, M. C. P., Beringer, J. E., Baumberg, S., Thomas, D. I. y Wellington, E. M. H. (1997). Molecular detection of streptomycin-producing streptomycetes in Brazilian soils. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**(4): 1288-1297.

Hughes, J. B., Hellmann, J. J., Ricketts, T. H. y Bohannon, B. J. M. (2001). Counting the uncountable: Statistical approaches to estimating microbial diversity. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(10): 4399-4406.

Hull, D. L. (1997). The ideal species concept-and why we can't get it. En *Species: The Units of Biodiversity*, pp. 357-380. Editado por A. D. a. M. W. MF Claridge. London, United Kingdom. Chapman & Hall.

Hulton, C. S. J., Higgins, C. F. y Sharp, P. M. (1991). ERIC sequences - a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiology*, **5**(4): 825-834.

Huneck, S. (1999). The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften*, **86**: 559-570.

Hunter, P. R. y Gaston, M. A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of Clinical Microbiology*, **26**(11): 2465-2466.

Hunter-Cervera, J. C., Fonda, M. E. y Belt, A. (1986). Isolation of cultures. En *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*, pp. 3-23. Editado por A. L. Demain y N. A. Solomon. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Huson, D., Richter, D., Rausch, C., Dezulian, T., Franz, M. y Rupp, R. (2007). Dendroscope: An interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC Bioinformatics*, **8**(1): 460-465.

Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. y White, T. J. (1990). PCR Protocols. A Guide to Methods and Amplifications. Academic Press. San Diego, CA.

Izumikawa, M., Khan, S. T., Takagi, M., Shin-Ya, K. (2010). Sponge-Derived Streptomyces Producing Isoprenoids via the Mevalonate Pathway. *Journal of Natural Products*, **73**: 208-212.

Jaccard, P. (1908) Distribution de la flore alpine dans le bassin des Dranses et dans quelques régions voisines. *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles*, **44**: 223-270.

Jain, R., Rivera, M. C. y Lake, J. A. (1999). Horizontal gene transfer among genomes: the complexity hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 3801-3806.

Janso, J. E. y Carter, G. T. (2010). Biosynthetic Potential of Phylogenetically Unique Endophytic Actinomycetes from Tropical Plants. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**(13): 4377-4386.

Jardine y Sibson (1971). Mathematical Taxonomy. John Wiley & Sons, New York.

Jensen, P. R., Dwight, R. y Fenical, W. (1991). Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**: 1102-1108.

Jensen, M. A., Webster, J. A. y Straus, N. (1993). Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms. *Applied and Environmental Microbiology*, **59**(4): 945-952.

Jensen, P. R. y Mafnas, C. (2006). Biogeography of the marine actinomycete *Salinispora*. *Environmental Microbiology*, **8**(11): 1881-1888.

Jiang, S., Li, X., Zhang, L., Sun, W., Dai, S., Xie, L., Liu, Y. y Lee, K. (2008). Culturable actinobacteria isolated from marine sponge *Iotrochota* sp. *Marine Biology*, **153**: 945-952.

Jonas, D., Spitzmuller, B., Weist, K., Ruden, H. y Daschner, F. D. (2003). Comparison of PCR-based methods for typing *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology and Infection*, **9**(8): 823-831.

Jukes, T. H. y Cantor, C. (1969). Evolution of Protein Molecules. En *Mammalian Protein Metabolism*, pp. 21-132. Academic Press. New York.

Julian, R. K., Higgs, R. E., Gygi, J. D. y Hilton, M. D. (1998). A method for quantitatively differentiating crude natural extracts using high-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, **70**, 3249-3254.

Kaeberlein, T., Lewis, K. y Epstein, S. S. (2002). Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science*, **296**: 1127-1129.

Kainz, A., Lubitz, W. y Busse, H. J. (2000). Genomic fingerprints, ARDRA profiles and quinone systems for classification of *Pasteurella sensu stricto*. *Systematic and Applied Microbiology*, **23**(4): 494-503.

Kalakoutskii, L. V., Zenova, G. M., Soina, V. S. y Likhacheva, A. A. (1990). Associations of actinomycetes with algae. *Actinomycetes*, **1**(2): 27-42.

Kalakutskaya, A. N., Zenova, G. M. y Dobrovolskaya, T. G. (1993). Effect of an actinomycete on the composition of the bacterial component in an actinomycete-lichen type of association. *Microbiology*, **62**(2): 203-207.

Kämpfer, P. y Kroppenstedt, R. M. (1991). Probabilistic identification of streptomycetes using miniaturized physiological tests. *Journal of General Microbiology*, **137**: 1893-1902.

Kaneda, T. (1991). Iso-fatty and anteiso-fatty acids in bacteria - biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiological Reviews*, **55**: 288-302.

Kawai, K., Wang, G., Okamoto, S. y Ochi, K. (2007). The rare earth, scandium, causes antibiotic overproduction in *Streptomyces* spp. *FEMS Microbiology Letters*, **274**(2): 311-315.

Kelecom, A. (2002). Secondary metabolites from marine microorganisms. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. **74**(1): 151-170.

Kell, D. B., Brown, M., Davey, H. M., Dunn, W. B., Spasic, I. y Oliver, S. G. (2005). Metabolic footprinting and systems biology: The medium is the message. *Nature Reviews Microbiology*, **3**: 557-565.

Kerstens y De Ley (1975). Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their protein patterns. *Journal of General Microbiology*. **87**: 333-342.

Khan, S. T., Izumikawa, M., Motohashi, K., Mukai, A., Takagi, M., Shin-Ya, K. (2010). Distribution of the 3-hydroxyl-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene and isoprenoid production in marine-derived Actinobacteria. *Fems Microbiology Letters*, **304**: 89-96.

Khosla, C., Gokhale, R.S., Jacobsen, J.R., y Cane, D.E. (1999). Tolerance and specificity of polyketide synthases. *Annual Review of Biochemistry*, **68**: 219-53.

Kim, O.S., Cho, Y.J., Lee, K., Yoon, S.H., Kim, M., Na, H., Park, S.C., Jeon, Y.S., Lee, J.H., Yi, H., Won, S., Chun, J. (2012). Introducing EzTaxon: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **62**, 716–721

Kim, M., Oh, H. S., Park, S. C. y Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **64**(2): 346-351.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, **16**: 111-120.

Kloos, W. E., Mohapatra, N., Dobrogosz, W. J., Ezzell, J. W. y Manclark, C. R. (1981). Deoxyribonucleotide sequence relationships among *Bordetella* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **31**(2): 173-176.

Kodali, S., Galgoci, A., Young, K., Painter, R., Silver, L. L., Herath, K. B., Singh, S. B., Cully, D., Barrett, J. F., Schmatz, D. y Wang, J. (2005). Determination of selectivity and efficacy of fatty acid synthesis inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, **280**(2): 1669-1677.

Koeuth, T., Versalovic, J. y Lupski, J. R. (1995). Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Research*, **5**(4): 408-418.

Kohring, L. L., Ringelberg, D. B., Devereux, R., Stahl, D. A., Mittelman, M. W. y White, D. C. (1994). Comparison of phylogenetic-relationships based on phospholipid fatty-acid profiles and ribosomal-RNA sequence similarities among dissimilatory sulfate-reducing bacteria. *Fems Microbiology Letters*, **119** (3): 303-308.

Komagata, K. y Suzuki, K. I. (1988). Lipid and Cell-Wall Analysis in Bacterial Systematics. *Methods in Microbiology*, **19**: 161-207

Konstantinidis, K. T. y Tiedje, J. M. (2005). Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **102**: 2567-2572.

Konstantinidis, K. T., Ramette, A., Tiedje, J. M. (2006). The bacterial species definition in the genomic era. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. **361**: 1929-1940.

Konstantinidis, K. T. y Tiedje, J. M. (2007). Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead. *Current Opinion in Microbiology*. **10**: 504-509.

Kosanic, M. y Rankovic, B. (2015). Lichen Secondary Metabolites as Potential Antibiotic Agents. En *Lichen Secondary Metabolites. Bioactive Properties and Pharmaceutical Potential*, pp. 81-104. Editado por Branislav Rankovic. Springer International Publishing Switzerland.

Krebs, C. J (1989). Ecology; Statistical methods. Harper & Row. New York.

Kroppenstedt, R. M. y Kutzner, H. J. (1976). Biochemical markers in taxonomy of actinomycetales. *Experientia*, **32**: 318-319.

Kroppenstedt, R. M. (1985). Fatty Acid and Menaquinone Analysis of Actinomycetes and Related Organisms. En *Chemical Methods in Bacterial Systematics*, pp. 173-199. Editado por Goodfellow, M. y Minnikin, D.E. Society for Applied Bacteriology.

Kroppenstedt, R. M. (1992). The Genus *Nocardioopsis*. En *The Prokaryotes*, pp. 1139-1156. Editado por A. T. Ballows, H. G.; Dworkin, M.; Harder, W.; Schleifer, K. H. Springer-Verlag. New York:

Kroppenstedt, R. M., Mayilraj, S., Wink, J. M., Kallow, W., Schumann, P., Secondini, C., Stackebrandt, E. (2005). Eight new species of the genus *Micromonospora*, *Micromonospora citrea* sp. nov., *Micromonospora echinaurantiaca* sp. nov., *Micromonospora echinofusca* sp. nov. *Micromonospora fulviviridis* sp. nov., *Micromonospora inyonensis* sp. nov., *Micromonospora peucetia* sp. nov., *Micromonospora sagamiensis* sp. nov., and *Micromonospora viridifaciens* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, **28**(4): 328-339.

Kuo, A. y Garrity, G.M. (2002). Exploiting microbial diversity. En *Biodiversity of Microbial Life*. Chichester, United Kingdom. Editado por Staley, J. y Reysenbach. Wiley, New York, pp 477-520.

Labeda, D. P. (1992). DNA-DNA hybridization in the systematics of *Streptomyces*. *Gene*, **115**: 249-253.

Labeda, D. P., Goodfellow, M., Chun, J., Zhi, X. Y. y Li, W. J. (2011). Reassessment of the systematics of the suborder *Pseudonocardineae*: transfer of the genera within the family *Actinosynnemataceae* Labeda and Kroppenstedt 2000 emend. Zhi et al. 2009 into an emended family *Pseudonocardiaceae* Embley et al. 1989 emend. Zhi et al. 2009. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **61**: 1259-1264.

Lam, K. S., Veitch, J. A., Golik, J., Rose, W. C., Doyle, T. W. y Forenza, S. (1995). Production and isolation of two novel esperamicins in a chemically defined medium. *Journal of Antibiotics*, **48**(12): 1497-1501.

Lan, R. y Reeves, P. R. (2000). Intraspecies variation in bacterial genomes: the need for a species genome concept. *Trends in Microbiology*, **8**(9): 396-401.

Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA Sequencing. En *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115-175. Editado por E. Stackebrandt y M. Goodfellow. Wiley, New York.

Lang, J. M., Darling, A. E. y Eisen, J. A. (2013). Phylogeny of bacterial and archaeal genomes using conserved genes: supertrees and supermatrices. *PLoS One*, **8**(4): e62510.

Lanoot, B., Vancanneyt, M., Cleenwerck, I., Wang, L., Li, W., Liu, Z. y Swings, J. (2002). The search for synonyms among streptomycetes by using SDS-PAGE of whole-cell proteins. Emendation of the species *Streptomyces aurantiacus*, *Streptomyces cacaoi* subsp. *cacaoi*, *Streptomyces caeruleus* and *Streptomyces violaceus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **52**: 823-829.

Lanoot, B., Vancanneyt, M., Dawyndt, P., Cnockaert, M., Zhang, J. L., Huang, Y., Liu, Z. H. y Swings, J. (2004). BOX-PCR fingerprinting as a powerful tool to reveal synonymous names in the genus *Streptomyces*. Emended descriptions are proposed for the species *Streptomyces cinereorectus*, *S. fradiae*, *S. tricolor*, *S. colombiensis*, *S. filamentosus*, *S. vinaceus* and *S. phaeopurpureus*. *Systematic and Applied Microbiology*, **27**(1): 84-92.

Lanoot, B., Vancanneyt, M., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Cnockaert, M. C., Dawyndt, P., Liu, Z. H., Huang, Y. y Swings, J. (2005). Grouping of streptomycetes using 16S-ITS RFLP fingerprinting. *Research in Microbiology*, **156**: 755-762.

Laurent, F., Carlotti, A., Boiron, P., Villard, J. y Freney, J. (1996). Ribotyping: A tool for taxonomy and identification of the *Nocardia asteroides* complex species. *Journal of Clinical Microbiology*, **34**(5): 1079-1082.

- Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G. y Marinelli, F. (2000).** Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*, **78**: 399-405.
- Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G. y Marinelli, F. (2001).** Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics (vol 78, pg 399, 2000). *Antonie van Leeuwenhoek*, **79**: 219-U7.
- Lechevalier, M. P. y Lechevalier, H. (1970).** Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **20**(4): 435-443.
- Lechevalier, M. P. (1977).** Lipids in bacterial taxonomy - Taxonomists view. *Critical Reviews in Microbiology*, **5**(2): 109-210.
- Lechevalier, M. P., De Bievre, C. y Lechevalier, H. (1977).** Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes - phospholipid composition. *Biochemical Systematics and Ecology*, **5**(4): 249-260.
- Lechevalier, H. A. (1989).** A practical guide to generic identification of actinomycetes. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 2344-2347. Editado por S. T. Williams, M. E. Sharpe y J. G. Holt. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Lee, K. A. y Kim, M. S. (2000).** Glucosidase inhibitor from *Umbilicaria esculenta*. *Canadian Journal of Microbiology*, **46**(11): 1077-1081.
- Lehtimäki, J., Lyra, C., Suomalainen, S., Sundman, P., Rouhiainen, L., Paulin, L., Salkinoja-Salonen, M. y Sivonen, K. (2000).** Characterization of *Nodularia* strains, cyanobacteria from brackish waters, by genotypic and phenotypic methods. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **50**: 1043-1053.
- Li, J., Zhao, G. Z., Chen, H. H., Wang, H. B., Qin, S., Zhu, W. Y., Xu, L. H., Jiang, C. L. y Li, W. J. (2008).** Antitumour and antimicrobial activities of endophytic streptomycetes from pharmaceutical plants in rainforest. *Letters in Applied Microbiology*, **47**: 574-580.
- Li, J., Zhao, G. Z., Huang, H. Y., Qin, S., Zhu, W. Y., Zhao, L. X., Xu, L. H., Zhang, S., Li, W. J. y Strobel, G. (2012).** Isolation and characterization of culturable endophytic actinobacteria associated with *Artemisia annua* L. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*, **101**: 515-527.
- Lilburn, T. G. y Garrity, G. M. (2004).** Exploring prokaryotic taxonomy. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**: 7-13.
- Loughney, K., Lund, E. y Dahlberg, J. E. (1982).** Transfer-RNA genes are found between the 16S and 23S ribosomal-RNA genes in *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research*, **10**: 1607-1624.

Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T. y de Bruijn, F. J. (1994). Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**(7): 2286-2295.

Louws, F. J., Schneider y de Bruijn. (1995). Assessing Genetic Diversity of Microbes Using Repetitive Sequence-Based PCR (rep-PCR). En *Nucleic Acid Amplification Methods for the Analysis of Environmental Samples*. Editado por Toranzos, G. Technomic Publishing Co.

Louws, F. J., Rademaker, J. L. W. y de Bruijn, F. J. (1999). The three Ds of PCR-based genomic analysis of phyto bacteria: Diversity, detection, and disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology*, **37**: 81-125.

Ludwig, J. A. y Reynolds, J. F. (1988). Statistical ecology: a primer of methods and computing. Wiley Press, New York, New York. 337 pp.

Ludwig, W. y Schleifer, K. H. (1994). Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, **15**(2-3): 155-173.

Ludwig, W., Strunk, O., Klugbauer, S., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Neumaler, J., Bachleitner, M. y Schleifer, K. H. (1998). Bacterial phylogeny based on comparative sequence analysis. *Electrophoresis* **19**: 554-568.

Ludwig, W. y Schleifer, K. H. (1999). Phylogeny of *Bacteria* beyond the 16S rRNA standard. *ASM News*, **65**: 752-757.

Lupski, J. R. y Weinstock, G. M. (1992). Short, interspersed repetitive dna-sequences in prokaryotic genomes. *Journal of Bacteriology*, **174**(14): 4525-4529.

Maes, N., DeGheldre, Y., DeRyck, R., Vaneechoutte, M., Meugnier, H., Etienne, J. y Struelens, M. J. (1997). Rapid and accurate identification of *Staphylococcus* species by tRNA intergenic spacer length polymorphism analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, **35**(10): 2477-2481.

Magee, J.T. (1994). Analytical fingerprinting methods. En *Chemical methods in prokaryotic systematics*, pp. 523-553. Goodfellow and A.G. O'Donnell (ed.). Academic Press, London, U.K.

Maiden, M. C. J., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M. y Spratt, B. G. (1998). Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 3140-3145.

Maier, T. y Kostrzewa, M. (2007). Fast and reliable MALDI-TOF MS-based microorganism identification. *Chimica Oggi-Chemistry Today*, **25**: 68-71.

Marinelli, F. y Genilloud, O. (2014). Antimicrobials. Editado por Marinelli, F. y Genilloud, O. Springer Berlin Heidelberg.

Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T., Andrew, P., Prudhomme, M., Alloing, G. y Hakenbeck, R. (1992). A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Research*, **20**(13): 3479-3483.

Martiny, J. B. H., Bohannan, B. J. M., Brown, J. H., Colwell, R. K., Fuhrman, J. A., Green, J. L., Horner-Devine, M. C., Kane, M., Krumins, J. A., Kuske, C. R., Morin, P. J., Naeem, S., Ovreas, L., Reysenbach, A. L., Smith, V. H. y Staley, J. T. (2006). Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature Reviews Microbiology*, **4**(2): 102-112.

Masco, L., Huys, G., Gevers, D., Verbruggen, L. y Swings, J. (2003). Identification of *Bifidobacterium* species using rep-PCR fingerprinting. *Systematic and Applied Microbiology*, **26**(4): 557-563.

Maukonen, J., Matto, J., Wirtanen, G., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T. y Saarela, M. (2003). Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **30**(6): 327-56.

McCarthy, A.J. y Williams, S.T. (1992) Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment – a review. *Gene*, **115**: 189–192.

McClelland, M. y Welsh, J. (1994). DNA-fingerprinting by arbitrarily primed PCR. In PCR- Methods Appl, pp. S59-S65: Cold Spring Harbor Laboratory.

McElvania, T. E., Shuey, S., Winkler, D. W., Butler, M. A. y Burnham, C. A. (2013). Optimizing identification of clinically relevant Gram-positive organisms by use of the Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system. *Journal of Clinical Microbiology*, **51**(5):1421-1427.

Mehling, A., Wehmeier, U. F. y Piepersberg, W. (1995a). Nucleotide sequences of streptomycete 16S ribosomal DNA: towards a specific identification system for streptomycetes using PCR. *Microbiology*, **141**: 2139-2147.

Mehling, A., Wehmeier, U.F. y Piepersberg, W. (1995b). Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays in identifying conserved regions of actinomycete genomes. *FEMS Microbiology Letters*, **128**(2): 119-25.

Meier-Kolthoff, J. P., Klenk, H. P. y Göker, M. (2014). Taxonomic use of DNA G+C content and DNA-DNA hybridization in the genomic age. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **64**(2): 352-356.

Mellmann, A., Cloud, J., Maier, T., Keckevoet, U., Ramminger, I., Iwen, P., Dunn, J., Hall, G., Wilson, D., LaSala, P., Kostrzewa, M. y Harmsen, D. (2008). Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time-of-Flight Mass Spectrometry in

Comparison to 16S rRNA Gene Sequencing for Species Identification of Nonfermenting Bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*, **46**(6), 1946–1954.

Mergaert, J., Verhelst, A., Cnockaert, M. C., Tan, T. L. y Swings, J. (2001). Characterization of facultative oligotrophic bacteria from polar seas by analysis of their fatty acids and 16S rDNA sequences. *Systematic and Applied Microbiology*, **24**(1): 98-107.

Metsä-Ketelä, M., Halo, L., Munukka, E., Hakala, J., Mantsala, P. y Ylihonko, K. (2002). Molecular evolution of aromatic polyketides and comparative sequence analysis of polyketide ketosynthase and 16s ribosomal DNA genes from various *Streptomyces* species. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 4472-4479.

Mevs, U., Stackebrandt, E., Schumann, P., Gallikowski, C.A. y Hirsch, P. (2000). *Modestobacter multiseptatus* gen. nov., sp. nov., a budding actinomycete from soils of the Asgard Range (Transantarctic Mountains). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **50**(1): 337-46.

Miao, V., Coeffet-LeGal, M. F., Brown, D., Sinnemann, S., Donaldson, G. y Davies, J. (2001). Genetic approaches to harvesting lichen products. *Trends in Biotechnology*, **19**(9): 349-355.

MIDI Manual. MIS Whole Cell Fatty Acid Analysis by Gas Chromatography. (1998).

Miller, L. T. (1982). Single derivatization method for routine analysis of bacterial whole-cell fatty acid methyl esters, including hydroxy acids. *Journal of Clinical Microbiology*, **16**(3): 584-586.

Minas, W., Bailey, J. E. y Duetz, W. (2000). Streptomyces in micro-cultures: Growth, production of secondary metabolites, and storage and retrieval in the 96-well format. *Antonie van Leeuwenhoek*, **78**(3-4): 297-305.

Mincer, T.J., Jensen, P.R., Kauffman, C.A. y Fenical, W. (2002). Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**(10): 5005-11.

Miyadoh, S. (1997). Atlas of actinomycetes. The society for actinomycetes Japan (ed). Japan.

Mohapatra, B. R., Broersma, K. y Mazumder, A. (2007). Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. *FEMS Microbiology Letters*, **277**: 98-106.

Mootz, H.D., Schwarzer, D. y Marahiel, A. (2002). Biosynthetic strategies of nonribosomal peptide synthetases. *ChemBioChem*. **3**: 490-504.

Morón, R., Gonzalez, I. y Genilloud, O. (1999). New genus-specific primers for the PCR identification of members of the genera *Pseudonocardia* and *Saccharopolyspora*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **49**(1): 149-162.

Moss, C. W., Dees, S. B. y Guerrant, G. O. (1980). Gas-liquid-chromatography of bacterial fatty-acids with a fused-silica capillary column. *Journal of Clinical Microbiology*, **12**(1): 127-130.

Moss, C. W. (1981). Gas-liquid-chromatography as an analytical tool in microbiology. *Journal of Chromatography*, **203**: 337-347.

Moss, C. W. y Núñez-Montiel, O. L. (1982). Analysis of short-chain acids from bacteria by gas-liquid-chromatography with a fused-silica capillary column. *Journal of Clinical Microbiology*, **15**(2): 308-311.

Motohashi, K., Takagi, M., Yamamura, H., Hayakawa, M. y Shin-ya, K. (2010). A new angucycline and a new butenolide isolated from lichen-derived *Streptomyces* spp. *Journal of Antibiotics*, **63**(9): 545-548.

Muller, K. D., Schmid, E. N. y Kroppenstedt, R. M. (1998). Improved identification of mycobacteria by using the Microbial Identification System in combination with additional trimethylsulfonium hydroxide pyrolysis. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**(9): 2477-2480.

Muller, K. (2001). Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **56**(1-2): 9-16.

Mullis, K. B. y Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, **155**: 335-350.

Mushegian, A. A., Peterson, C. N., Baker, C. C. M. y Pringle, A. (2011). Bacterial diversity across individual lichens. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**: 4249-4252.

Nagpal, M. L., Fox, K. F. y Fox, A. (1998). Utility of 16S-23S rRNA spacer region methodology: how similar are interspace regions within a genome and between strains for closely related organisms? *Journal of Microbiological Methods*, **33**: 211-219.

Najar-Rodríguez, A.J., McGraw, E.A., Mensah, R.K., Pittman, G.W., y Walter, G.H. (2009) The microbial flora of *Aphis gossypii*: patterns across host plants and geographical space. *Journal of Invertebrate Pathology*, **100**: 123–126.

Ndowora, T. C. R., Kinkel, L. L., Jones, R. K. y Anderson, N. A. (1996). Fatty acid analysis of pathogenic and suppressive strains of *Streptomyces* species isolated in Minnesota. *Phytopathology*, **86**(2): 138-143.

Neefs, J.-M., van de Peer, Y., Hendriks, L. y de Wachter, R. (1990). Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Research*, **18**: 2237-2317.

Newman, D. J. y Cragg, G. M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, **70**(3): 461-477.

Newman, D. J. y Cragg, G. M. (2012). Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*; **75**:311-335.

Nicholson, T.P., Rudd, B.A., Dawson, M., Lazarus, C.M., Simpson, T.J. y Cox, R.J. (2001). Design and utility of oligonucleotide gene probes for fungal polyketide synthases. *Chemical Biology*, **8**(2): 157-78.

Nick, G., Jussila, M., Hoste, B., Niemi, R. M., Kaijalainen, S., de Lajudie, P., Gillis, M., de Bruijn, F. J. y Lindstrom, K. (1999). Rhizobia isolated from root nodules of tropical leguminous trees characterized using DNA-DNA dot-blot hybridisation and rep-PCR genomic fingerprinting. *Systematic and Applied Microbiology*, **22**(2): 287-299.

Nisbet, L. J. y Moore, M. (1997). Will natural products remain an important source of drug research for the future? *Current Opinion in Biotechnology*, **8**: 708-712.

Nolan, R. D. y T., C. (1988). Isolation and screening of actinomycetes. En *Actinomycetes in Biotechnology*. Editado por M. Goodfellow, Mordarski, M., Williams, S. T. Academic Press Inc., San Diego.

Nonomura, H. y Ohara, Y. (1971a). Distribution of actinomycetes in soil .X. New genus and species of monosporic actinomycetes. *Journal of Fermentation Technology*, **49**(11): 895-903.

Nonomura, H. y Ohara, Y. (1971b). Distribution of actinomycetes in soil .XI. Some new species of the genus *Actinomadura* Lechevalier *et al.* *Journal of Fermentation Technology*, **49**(11): 904-912.

Norse, E. A., Rosenbaum, K. L., Wilcove, D. S., Wilcox, B. A., Romme, W. H., Johnston, D. W. y Stout, M. L. (1986). Conserving Biological Diversity in Our National Forests. The Wilderness Society. Washington DC.

Novella, I. S., Marín, I. y Sánchez, J. (1996). Restriction analysis of actinomycetes chromosomal DNA. *Canadian Journal of Microbiology*, **42**(2): 201-206.

Novick, R. P. (1991). Genetic systems in Staphylococci. Methods in Enzymology. H. M. Jeffrey, Academic Press. Volumen **204**: 587-636.

Obata, H., Muryoi, N., Kawahara, H., Yamade, K. y Nishikawa, J. (1999). Identification of a novel ice-nucleating bacterium of Antarctic origin and its ice nucleation properties. *Cryobiology*. **38**(2): 131-139.

O'Donnell, A. G., Goodfellow, M. y Minnikin, D. E. (1982). Lipids in the classification of *Nocardioide*s: reclassification of *Arthrobacter simplex* (Jensen) lochhead in the genus *Nocardioide*s (*Prauser*) emend. O'Donnell *et al.* as *Nocardioide*s *simplex* comb. nov. *Archives of Microbiology*, **133**(4): 323-329.

Okoro, C., Brown, R., Jones, A., Andrews, B., Asenjo, J., Goodfellow, M. y Bull, A. (2009). Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile. *Antonie van Leeuwenhoek*. **95**: 121-133.

Oksanen, I., Jokela, J., Fewer, D. P., Wahlsten, M., Rikkinen, J. y Sivonen, K. (2004). Discovery of rare and highly toxic microcystins from lichen-associated cyanobacterium *Nostoc* sp. strain IO-102-I. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**(10): 5756-5763.

Oksanen, I. (2006). Ecological and biotechnological aspects of lichens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **73**(4): 723-734.

Olive, D. M. y Bean, P. (1999). Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**(6): 1661-1669.

O'Malley, M. A. (2007). The nineteenth century roots of 'everything is everywhere'. *Nature Reviews Microbiology*, **5**: 647-651.

Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y. y Hattori, M. (2001). Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: Deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**(21): 12215-12220.

Oren, A. y Garrity, G. M. (2013). Then and now: a systematic review of the systematics of prokaryotes in the last 80 years. *Antonie van Leeuwenhoek*, Published online: 05 December 2013.

Ouhdouch, Y., Barakate, M. y Finance, C. (2001). Actinomycetes of Moroccan habitats: isolation and screening for antifungal activities. *European Journal Soil Biology*, **37**: 69-74.

Oves-Costales, D. y Challis., G. L. (2012). Mining Microbial Genomes for Metabolic Products of Cryptic Pathways. En *Drug Discovery from Natural Products*. Editado por Genilloud, O. y Vicente, F. Royal Society of Chemistry.

Palleroni, N. J. (1980). A chemotactic method for the isolation of *Actinoplanaceae*. *Archives of Microbiology*, **128**: 53-55.

Pankratov, T. (2012). Acidobacteria in microbial communities of the bog and tundra lichens. *Microbiology*, **81**: 51-58.

Pascual, F. J. (2010). Taxonomía molecular el clado central del género *Vibrio* y otras *Vibrionaceae*. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia.

Pathom-aree, W., Stach, J., Ward, A., Horikoshi, K., Bull, A. y Goodfellow, M. (2006). Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles*. **10**(3): 181-189.

Payne, D. J., Gwynn, M. N., Holmes, D. J. y Pompliano, D. L. (2007). Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, **6**: 29-40.

Pearson, K. (1926). On the coefficient of racial likeness. *Biometrika*, **18**: 105-117.

Pearson, W. R. y Lipman, D. J. (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**(8): 2444-2448.

Pelaez, F., Collado, J., Arenal, F., Basilio, A., Cabello, A., Matas, M. T. D., García, J. B., González del Val, A., Gonzalez, V., Gorrochategui, J., Hernandez, P., Martin, I., Platas, G. y Vicente, F. (1998). Endophytic fungi from plants living on gypsum soils as a source of secondary metabolites with antimicrobial activity. *Mycological Research*, **102**: 755-761.

Peláez, F. and Genilloud, O. (2003). Discovering new drugs from microbial natural products, pp. 1-22. En *Microorganisms for Health Care, Food and Enzyme Production* Editado por Barredo, J. L. Research Signpost Ed, Kerala, India.

Peláez, F. y Genilloud, O. (2009). Nuevos fármacos basados en productos naturales de origen microbiano. DOI: <http://dx.doi.org/ES/monoranf.v0i0.533>

Penesyan, A., Kjelleberg, S. y Egan, S. (2010). Development of novel drugs from marine surface associated microorganisms. *Marine Drugs*, **8**: 438-59.

Penn, K., Jenkins, C., Nett, M., Udworthy, D. W., Gontang, E. A., McGlinchey, R. P., Foster, B., Lapidus, A., Podell, S., Allen, E. E., Moore, B. S. y Jensen, P. R. (2009). Genomic islands link secondary metabolism to functional adaptation in marine Actinobacteria. *ISME Journal*, **3**(10): 1193-1203. International Society for Microbial Ecology.

Peña, J. A., Li, S. Y., Wilson, P. H., Thibodeau, S. A., Szary, A. J. y Versalovic, J. (2004). Genotypic and phenotypic studies of murine intestinal lactobacilli: Species differences in mice with and without colitis. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**(1): 558-568.

Pernodet, J. L., Boccard, F., Alegre, M. T., Gagnat, J. y Guerineau, M. (1989). Organization and nucleotide sequence analysis of a ribosomal RNA gene cluster from *Streptomyces ambofaciens*. *Gene* **79**, 33-46.

Petersen, C. E., Valentine, N. B. y Wahl, K. L. (2009). Characterization of microorganisms by MALDI mass spectrometry. En *Mass Spectrometry of Proteins and Peptides*, **492**:367-379. Editado por M. Lipton y L. Paša-Tolic. Humana Press.

Petrini, O., Hake, U. y Dreyfuss, M.M. (1990). Lichens. *Mycologia*, **82**: 444–451.

Pfaller, M. A., y A. L. Barry. (1994). Evaluation of a novel colorimetric broth microdilution method for antifungal susceptibility testing of yeast isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, **32**:1992-1996.

Pietra, F. (2001). Biodiversity and Natural Product Diversity. *Tetrahedron Organic Chemistry Series*. Volumen 21. Pergamon, Amsterdam.

Pineda, F. J., Antoine, M. D., Demirev, P.A., Feldman, A. B., Jackman, J., Longenecker, M. y Lin, J. S. (2003). Microorganism identification by matrix-assisted laser/desorption ionization mass spectrometry and model-derived ribosomal protein biomarkers. *Analytical Chemistry*, **75**(15):3817-3822.

Portevin, D., de Sousa-D'Auria, C., Houssin, C., Grimaldi, C., Chami, M., Daffé, M. y Guilhot, C. (2004). A polyketide synthase catalyzes the last condensation step of mycolic acid biosynthesis in mycobacteria and related organisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**(1): 314-319.

Pot, B., Willems, A., Gillis, M. y De Ley, J. (1992). Intra- and intergeneric relationships of the genus *Aquaspirillum*: *Prolinoborus*, a new genus for *Aquaspirillum fasciculus*, with the species *Prolinoborus fasciculus* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **42**(1): 44-57.

Pot, B., Hertel, C., Ludwig, W., Descheemaeker, P., Kersters, K. y Schleifer, K.-H. (1993). Identification and classification of *Lactobacillus Acidophilus*, *L. Gasseri* and *L. Johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probe hybridization. *Journal of General Microbiology*, **139**(3): 513-517.

Pot, B., Vandamme, P. y Kersters, K. (1994). Analysis of electrophoretic whole organism protein fingerprints. En *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*. (Vol. 5, pp. 493–521). Editado por M. Goodfellow & A. G. O'Donnell (Eds.), Chichester, UK. John Wiley & Sons.

Printzen, C., Fernández-Mendoza, F., Muggia, L., Berg, G. y Grube, M. (2012). Alphaproteobacterial communities in geographically distant populations of the lichen *Cetraria aculeata*. *FEMS Microbiology Ecology*, **82**(2): 316-325.

Proksch, P., Edrada, R. A. y Ebel, R. (2002). Drugs from the seas - current status and microbiological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **59**: 125-134.

Rademaker, J. L. W. y De Bruijn, F. J. (1997). Characterization and classification of microbes by rep-PCR genomic fingerprinting and computer assisted pattern analysis. En *DNA markers: Protocols, applications, and overviews*, pp. 151-171. Editado por G. Caetano-Anollés y P. M. Gresshoff. John Wiley.

Rademaker, J. L. W., Louws, F. J., de Bruijn, F. J. (1998). Characterization of the diversity of ecologically important microbes by rep-PCR genomic fingerprinting. En *Molecular Microbial Ecology Manual* 3.4.3/1–3.4.3/27. Editado por Akkermans A. D. L., van Elsas J. D., de Bruijn F. J. Kluwer Academic Publishers; Dordrecht, The Netherlands.

Rademaker, J. L. W., Hoste, B., Louws, F. J., Kersters, K., Swings, J., Vauterin, L., Vauterin, P. y de Bruijn, F. J. (2000). Comparison of AFLP and rep-PCR genomic

fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **50**(2): 665-677.

Rademaker, J. L. W., Herbet, H., Starrenburg, M. J. C., Naser, S. M., Gevers, D., Kelly, W. J., Hugenholtz, J., Swings, J. y Vlieg, J. (2007). Diversity analysis of dairy and nondairy *Lactococcus lactis* isolates, using a novel multilocus sequence analysis scheme and (GTG)₅-PCR fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**(22): 7128-7137.

Rainey, F. A., Ward-Rainey, N. L., Janssen, P. H., Hippe, H. y Stackebrandt, E. (1996). *Clostridium paradoxum* DSM 7308^T contains multiple 16S rRNA genes with heterogeneous intervening sequences. *Microbiology* **142**, 2087–2095.

Ramasamy, D., Mishra, A. K., Lagier, J. C., Padhmanabhan, R., Rossi, M., Sentausa, E., Raoult, D. y Fournier, P. E. (2014). A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **64**(2): 384-391.

Ramette, A. (2007). Multivariate analyses in microbial ecology. *FEMS Microbiology Ecology*, **62**: 142-160.

Rateb, M. E., Houssen, W. E., Harrison, W. T., Deng, H., Okoro, C. K., Asenjo, J. A., Andrews, B. A., Bull, A. T., Goodfellow, M., Ebel, R. y Jaspars, M. (2011). Diverse metabolic profiles of a *Streptomyces* strain isolated from a hyper-arid environment. *Journal of Natural Products*, **74**: 1965-71.

Rementeria, A., Gallego, L., Quindos, G. y Garaizar, J. (2001). Comparative evaluation of three commercial software packages for analysis of DNA polymorphism patterns. *Clinical Microbiology and Infection*, pp. 331-336.

Richter, M. y Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**: 19126-19131.

Ritacco, F.V., Haltli, B., Janso, J.E., Greenstein, M. y Bernan, V.S. (2003). Dereplication of *Streptomyces* soil isolates and detection of specific biosynthetic genes using an automated ribotyping instrument. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **30**(8): 472-479.

Roberts, P. D., Hodge, N. C., Bouzar, H., Jones, J. B., Stall, R. E., Berger, R. D. y Chase, A. R. (1998). Relatedness of strains of *Xanthomonas fragariae* by restriction fragment length polymorphism, DNA-DNA reassociation and fatty acid analyses. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 3961-3965.

Rojas, J. L., Martín, J., Tormo, J. R., Vicente, M. F., Brunati, M., Ciciliato, I., Losi, D., Van Trappen, S., Mergaert, J., Swings, J., Marinelli, F. and Genilloud, O. (2009). Bacterial diversity from benthic mats of Antarctic lakes as a source of new bioactive metabolites. *Marine Genomics*, **2**(1): 33-41.

Rong, X. y Huang, Y. (2010). Taxonomic evaluation of the *Streptomyces griseus* clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, with proposal to combine 29 species and three subspecies as 11 genomic species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **60**: 696-703.

Rong, X., Liu, N., Ruan, J. y Huang, Y. (2010). Multilocus sequence analysis of *Streptomyces griseus* isolates delineating intraspecific diversity in terms of both taxonomy and biosynthetic potential. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **98**: 237-248.

Rong, X. y Huang, Y. (2012). Taxonomic evaluation of the *Streptomyces hygroscopicus* clade using multilocus sequence analysis and DNA-DNA hybridization, validating the MLSA scheme for systematics of the whole genus. *Systematic and Applied Microbiology*. **35**: 7-18.
Rossbach, S. R., Rasul, G., Schneider, M., Eardly, B. y de Bruijn F. J. (1995). Structural and functional conservation of the rhizopine catabolism (moc) locus is limited to selected *Rhizobium meliloti* strains and unrelated to their geographical origin. *Molecular Plant-microbe Interactions*. **8**(4):549-559.

Rosselló-Mora, R. y Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*, **25**(1): 39-67.

Rosselló-Móra, R. (2006). DNA-DNA Reassociation Methods Applied to Microbial Taxonomy and Their Critical Evaluation. *Molecular Identification, Systematics, and Population Structure of Prokaryotes*. E. Stackebrandt, Springer Berlin Heidelberg: 23-50.

Roth, A., Fischer, M., Hamid, M. E., Michalke, S., Ludwig, W. y Mauch, H. (1998). Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**: 139-147.

Roumagnac, P., Gagnevin, L., Gardan, L., Sutra, L., Manceau, C., Dickstein, E. R., Jones, J. B., Rott, P. y Pruvost, O. (2004). Polyphasic characterization of xanthomonads isolated from onion, garlic and Welsh onion (*Allium* spp.) and their relatedness to different *Xanthomonas* species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**: 15-24.

Russell, J.A., Goldman-Huertas, B., Moreau, C.S., Baldo, L., Stahlhut, J.K., Werren, J.H., and Pierce, N.E. (2009). Specialization and geographic isolation among *Wolbachia* symbionts from ants and lycaenid butterflies. *Evolution* **63**: 624–640.

Saadoun, I., Hameed, K. M. y Moussauui, A. (1999). Characterization and analysis of antibiotic activity of some aquatic actinomycetes. *Microbios*, **99**: 173-179.

Sadowsky, M. J., Kinkel, L. L., Bowers, J. H. y Schottel, J. L. (1996). Use of repetitive intergenic DNA sequences to classify pathogenic and disease-suppressive *Streptomyces* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**(9): 3489-3493.

Saitou, N. y Nei, M. (1987). The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**(4): 406-425.

Salazar, O., Gonzalez, I. y Genilloud, O. (2002). New genus-specific primers for the PCR identification of novel isolates of the genera *Nocardiopsis* and *Saccharothrix*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **52**: 1411-1421.

Salazar, O., Valverde, A. y Genilloud, O. (2006). Real-Time PCR for the detection and quantification of *Geodermatophilaceae* from stone samples and identification of new members of the genus *Blastococcus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **72**(1): 346-352.

Sánchez-Andrea, I., Rodríguez, N., Amils, R. and Sanz, J. L. (2011). Microbial diversity in anaerobic sediments at Río Tinto, a naturally acidic environment with a high heavy metal content. *Applied and Environmental Microbiology*. **77**(17): 6085-6093.

Sander, A., Ruess, M., Bereswill, S., Schuppler, M. y Steinbrueckner, B. (1998). Comparison of different DNA fingerprinting techniques for molecular typing of *Bartonella henselae* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**(10): 2973-2981.

Sanglier, J. J., Wellington, E. M. H., Behal, V., Fiedler, H. P., Ghorbel, R. E., Finance, C., Hacene, M., Kamoun, A., Kelly, C., Mercer, D. K., Prinzis, S. y Trigo, C. (1993). Novel bioactive compounds from actinomycetes. *Research in Microbiology*, **144**(8): 661-663.

Sanglier, J. J., Haag, H., Huck, J. A. y Fehr, T. (1996). Review of actinomycetes compounds 1990–1995. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, **5**: 207–223.

Sasser, M., Fieldhouse, D. J. y Carter, C. N. (1984). Computer-assisted identification of bacteria based on fatty-acid analysis. *Phytopathology*, **74**(7), 882-882.

Sasser, M. (1990a). MIDI-Technical Note # 101. Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids. Chapter. 13. pp 165-171.

Sasser, M. (1990b). MIDI-Technical Note # 102. “Tracking” a Strain using the Microbial Identification System. Chapter. 13. pp. 172-174.

Sasser, M. (1993). Bacterial Identification by Sherlock Through Fatty Acid Analysis. Chapter. 13. pp. 180-182.

Sauer, S., Freiwald, A., Maier, T., Kube, M., Reinhardt, R., Kostrzewa, M. y Geide, K. (2008). Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS One* **3**:e2843.

Savelkoul, P. H., Aarts, H. J., de Haas, J., Dijkshoorn, L., Duim, B., Otsen, M., Rademaker, J. L., Schouls, L. y Lenstra, J. A. (1999). Amplified-fragment length polymorphism analysis: the state of an art. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**(10): 3083-91.

Schaal (1985). Identification of clinically significant actinomycetes and related bacteria using chemical techniques. En *Chemical Methods in Bacterial Systematics*. Editado por Goodfellow, M. y Minnikin, D.E. Society for Applied Bacteriology.

Schimana, J., Walker, M., Zeeck, A. y Fiedler, H. P. (2001). Simocyclinones: diversity of metabolites is dependent on fermentation conditions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **27**: 144-148.

Schleifer, K. H. y Stackebrandt, E. (1983). Molecular systematics of prokaryotes. *Annual Review of Microbiology*, **37**: 143-187.

Schneemann, I., Nagel, K., Kajahn, I., Labes, A., Wiese, J. y Imhoff, J. F. (2010). Comprehensive investigation of marine actinobacteria associated with the sponge *Halichondria panicea*. *Applied and Environmental Microbiology*, **76**(11): 3702-3714.

Schneider, M., De Bruijn, F.J., (1996). Rep-PCR mediated genomic fingerprinting of rhizobia and computer assisted phylogenetic pattern analysis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **12**: 163-174.

Schwarzer, D., Finking, R. y Marahiel, M. A. (2003). Nonribosomal peptides: from genes to products. *Natural Product Reports*, **20**(3): 275-287.

Selbmann, L., Zucconi, L., Ruisi, S., Grube, M., Cardinale, M. y Onofri, S. (2010). Culturable bacteria associated with Antarctic lichens: affiliation and psychrotolerance. *Polar Biology*, **33**: 71-83.

Selje, N., M. Simon y T. Brinkhoff. (2004). A newly discovered *Roseobacter* cluster in temperate and polar oceans. *Nature*, **427**:445–448.

Sharples, G. J. y Lloyd, R. G. (1990). A novel repeated DNA-sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes. *Nucleic Acids Research*, **18**(22), 6503-6508.

Shen, B. (2003). Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Current Opinion in Chemical Biology*, **7**(2): 285-295.

Shoemaker, J. S. y Fitch, W. M. (1989). Evidence from nuclear sequences that invariable sites should be considered when sequence divergence is calculated. *Molecular Biology and Evolution*. **6**:270-289.

Sigmund, J. M., Clark, D. C., Rainey, F. A. y Anderson, A. S. (2003). Detection of eubacterial 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductases from natural populations of actinomycetes. *Microbial Ecology*, **46**(1): 106-112.

Sikorski, J., Rossello-Mora, R. y Lorenz, M. G. (1999). Analysis of genotypic diversity and relationships among *Pseudomonas stutzeri* strains by PCR-based genomic fingerprinting and multilocus enzyme electrophoresis. *Systematic and Applied Microbiology*, **22**(3): 393-402.

Simpson, E. H. (1949). Measurement of Diversity. *Nature*, **163**: 688-688.

Singh, S. B., Genilloud, O. y Peláez, F. (2010). Terrestrial Microorganisms – Filamentous Bacteria. En “Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology”. Editado por Mander, L., Lui, H. W. Elsevier, Oxford. Volume 2, pp.109–140

Smole, S. C., King, L., Leopold, P. E. y Arbeit, R. D. (2002). Sample preparation of Gram-positive bacteria for identification by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight. *Journal of Microbiological Methods*, **48**: 107– 115.

Sneath, P. H. A. y Sokal, R. R. (1973). Numerical taxonomy. San Francisco, Calif. W. H. Freeman & Co.

Sokal, R. R. y Michener, C. D. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin*, **38**: 1409-1438.

Soller, R., Hirsch, P., Blohm, D. y Labrenz, M. (2000). Differentiation of newly described Antarctic bacterial isolates related to *Roseobacter* species based on 16S-23S rDNA internal transcribed spacer sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50**(2), 909-915.

Song, J., Lee, S. C., Kang, J.-W., Baek, H. J. y Suh, J.-W. (2004). Phylogenetic analysis of *Streptomyces* spp. isolated from potato scab lesions in Korea on the basis of 16S rRNA gene and 16S-23S rDNA internally transcribed spacer sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **54**(1): 203-209.

Sosio, M., Bossi, E., Bianchi, A. y Donadio, S. (2000). Multiple peptide synthetase gene clusters in Actinomycetes. *Molecular Genetics and Genomics*, **264**: 213-221.

Sponga, F., Cavaletti, L., Lazzarini, A., Borghi, A., Ciciliato, I., Losi, D. y Marinelli, F. (1999). Biodiversity and potentials of marine-derived microorganisms. *Journal of Biotechnology*, **70**: 65-69.

Stackebrandt, E., Witt, D., Kemmerling, C., Kroppenstedt, R. y Liesack, W. (1991). Designation of streptomycete 16S and 23S rRNA-based target regions for oligonucleotide probes. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**, 1468-1477.

Stackebrandt, E., Liesack, W. y Witt, D. (1992). Ribosomal RNA and rDNA sequence analyses. *Gene* **115**, 255-260.

Stackebrandt, E. y Goebel, B. M. (1994). A place for DNA-DNA reassociation and 16S ribosomal-RNA sequence-analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **44**(4): 846-849.

Stackebrandt, E., Rainey, F. A. y Ward-Rainey, N. L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **47**(2): 479-491.

Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P., Kämpfer, P., Maiden, M., Nesme, X., Rosselló-Mora, R., Swings, J., Truper, H. G., Vauterin, L., Ward, A. C., y Whitman, W. B. (2002). Report of the *ad hoc* committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **52**(3): 1043-1047.

Stackebrandt, E. y Ebers, J. (2006). Taxonomic parameters revisited: tarnished gold standards. *Microbiology Today*. **33**: 152-155.

Staley, J. T. y Gosink, J. J. (1999). Poles apart: biodiversity and biogeography of sea ice bacteria. *Annual Review of Microbiology*, **53**:189–215.

Staley, J. T. (2006). The bacterial species dilemma and the genomic/phylogenetic species concept. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **361**: 1899-1909.

Stead, D. E., Sellwood, J. E., Wilson, J. y Viney, I. (1992). Evaluation of a commercial microbial identification system based on fatty-acid profiles for rapid, accurate identification of plant pathogenic bacteria. *Journal of Applied Bacteriology*, **72**(4): 315-321.

Stern, M. J., Ames, G. F. L., Smith, N. H., Robinson, E. C. y Higgins, C. F. (1984). Repetitive extragenic palindromic sequences - a major component of the bacterial genome. *Cell*, **37**(3): 1015-1026.

Strobel, G. y Daisy, B. (2003). Bioprospecting for Microbial Endophytes and Their Natural Products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. **67**(4): 491-502.

Strohl, W. R. (1999). Secondary Metabolites, Antibiotics. *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*. M. C. F. y. S. W. Drew, John Wiley & Sons, Inc.

Suay, I., Arenal, F., Asensio, F. J., Basilio, A., Cabello, A., Díez, M. T., García, J. B., González del Val, A., Gorrochategui, J., Hernández, P., Peláez, F. y Vicente, F. (2000). Screening of basidiomycetes for antimicrobial activities. *Antonie van Leeuwenhoek*, **78**(2): 129-140.

Swofford, D. L. (2001). PAUP*, Phylogenetic Analysis using Parsimony (* and Other Methods). Sinauer Associates. Sunderland, USA.

Tajima, F. y Nei, M. (1984). Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Molecular Biology and Evolution*. **1**(3):269-285.

Takahashi, Y. and Omura, S. (2003). Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *Journal of General and Applied Microbiology*, **49**(3): 141-54.

- Tamura, K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, y Kumar S. (2011)** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, **28**: 2731-2739.
- Taylor, M. W., Schupp, P.J., de Nys, R., Kjelleberg, S., y Steinberg, P.D. (2005).** Biogeography of bacteria associated with the marine sponge *Cymbastela concentrica*. *Environmental Microbiology* **7**: 419–433.
- Taylor, M. W., Radax, R., Steger, D., y Wagner, M. (2007).** Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **71**(2): 295–347.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T. J. (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**(22): 4673-4680.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F. D. R., Jeanmougin, F. O. y Higgins, D. G. (1997).** The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. *Nucleic Acids Research*, **25**(24): 4876-4882.
- Tighe, S. W., de Lajudie, P., Dipietro, K., Lindstrom, K., Nick, G. y Jarvis, B. D. W. (2000).** Analysis of cellular fatty acids and phenotypic relationships of *Agrobacterium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* species using the Sherlock Microbial Identification System. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **50**(2): 787-801.
- Tindall, B. J., Brambilla, E., Steffen, M., Neumann, R., Pukall, R., Kroppenstedt, R. M. y Stackebrandt, E. (2000).** Cultivable microbial biodiversity: gnawing at the Gordian knot. *Environmental Microbiology*, **2**(3): 310-318.
- Tindall, B. J., Rosselló-Móra, R., Busse, H. J., Ludwig, W. y Kämpfer, P. (2010).** Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **60**(1): 249-266.
- Tom, C. J. H., Kerry, A. W., James, A. H. y Bruce, F. M. (2003).** Using ecological diversity measures with bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, **43**(1): 1-11.
- Tonjum, T., Welty, D. B., Jantzen, E. y Small, P. L. (1998).** Differentiation of *Mycobacterium ulcerans*, *M. marinum*, and *M. haemophilum*: Mapping of their relationships to *M. tuberculosis* by fatty acid profile analysis, DNA-DNA hybridization, and 16S rRNA gene sequence analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**(2): 918-925.
- Torkko, P., Suutari, M., Suomalainen, S., Paulin, L., Larsson, L. y Katila, M. L. (1998).** Separation among species of *Mycobacterium terrae* complex by lipid analyses: Comparison with biochemical tests and 16S rRNA sequencing. *Journal of Clinical Microbiology*, **36**(2): 499-505.

Torsvik, V., Sorheim, R. y Goksoyr, J. (1996). Total bacterial diversity in soil and sediment communities - A review. *Journal of Industrial Microbiology*, pp. 170-178.

Torsvik, V., Ovreas, L. y Thingstad, T. F. (2002). Prokaryotic diversity - Magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science*, **296**(5570): 1064-1066.

Trigo, C. (1993). Novel bioactive compounds from actinomycetes. *Research in Microbiology*, **144**: 661-663.

Trujillo, M. E., Fernandez-Molinero, C., Velazquez, E., Kroppenstedt, R. M., Schumann, P., Mateos, P. F. y Martínez-Molina, E. (2005). *Micromonospora mirobrigensis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **55**(2): 877-880.

Trujillo, M. E., Kroppenstedt, R. M., Schumann, P., Carro, L. y Martínez-Molina, E. (2006). *Micromonospora coriariae* sp. nov., isolated from root nodules of *Coriaria myrtifolia*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **56**(10): 2381-2385.

Trujillo, M. E., Kroppenstedt, R. M., Fernández-Molinero, C., Schumann, P. y Martínez-Molina, E. (2007). *Micromonospora lupini* sp. nov. and *Micromonospora saelicesensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Lupinus angustifolius*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **57**(12): 2799-2804.

Trujillo, M. E., Alonso-Vega, P., Rodríguez, R., Carro, L., Cerda, E., Alonso, P., Martínez-Molina, E. (2010). The genus *Micromonospora* is widespread in legume root nodules: the example of *Lupinus angustifolius*. *International Society for Microbial Ecology*. **4**: 1265-1281.

Tulp, M. y Bohlin, L. (2002). Functional versus chemical diversity: is biodiversity important for drug discovery? *Trends in Pharmacological Sciences*, **23** (5): 225-231.

Ulrich, R. y Friend, S.H. (2001). Toxicogenomics and drug discovery: will new technologies help us produce better drugs? *Nature Reviews Drug Discovery*, **1**: 84-88.

Ursing, J. B., Rosselló-Mora, R. A., García-Valdés, E. y Lalucat, J. (1995). Taxonomic Note: a pragmatic approach to the nomenclature of phenotypically similar genomic groups. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **45**(3): 604.

van Baar, B. L. M. (2000). Characterisation of bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionisation and electrospray mass spectrometry. *FEMS Microbiology Reviews*, **24**(2): 193-219.

van Belkum, A., Sluijter, M, de Groot, R., Verbrugh, H. y Hermans, P. W. (1996). Novel BOX repeat PCR assay for high-resolution typing of *Streptococcus pneumoniae* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. **34** (5): 1176-1179.

van der Gucht, K., Cottenie, K., Muylaert, K., Vloemans, N., Cousin, S., Declerck, S., Jeppesen, E., Conde-Porcuna, J. M., Schwenk, K., Zwart, G., Degans, H., Vyverman,

W. y De Meester, L. (2007). The power of species sorting: Local factors drive bacterial community composition over a wide range of spatial scales. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**(51): 20404-20409.

Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R. y De Ley, J. (1991). Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* Taxonomy: Emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **41**(1): 88-103.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., DeVos, P., Kersters, K. y Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiological Reviews*, **60**(2): 407-438.

Vaneechoutte, M. (1996). DNA fingerprinting techniques for microorganisms. A proposal for classification and nomenclature. *Molecular Biotechnology*, **6**(2): 115-142.

Vaneechoutte, M., Boerlin, P., Tichy, H. V., Bannerman, E., Jager, B. y Bille, J. (1998). Comparison of PCR-based DNA fingerprinting techniques for the identification of *Listeria* species and their use for atypical *Listeria* isolates. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **48**(1): 127-139.

Vaneechoutte, M., Vauterin, L., van Harsselaar, B., Dijkshoorn, L. y De Vos, P. (1999). Considerations in evaluation of the applicability of DNA fingerprinting techniques for species differentiation. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**(10): 3428-3429.

van Ooyen, A. (2001). Theoretical Aspects of Pattern Analysis. En *New approaches for the generation and analysis of microbial typing data*, pp. 31-46. Editado por L. Dijkshoorn, K. J. Towner y M. Struelens. Elsevier Science. Amsterdam, Holanda.

van Regenmortel, M. H. V. (1997). Viral species. En *Species: The Units of Biodiversity*, pp. 17-24. Editado por M. F. Claridge, A. H. Dawah and M. R. Wilson. Chapman & Hall. London, United Kingdom.

van Trappen, S., Mergaert, J., Van Eygen, S., Dawyndt, P., Cnockaert, M. C. and Swings, J. (2002). Diversity of 746 heterotrophic bacteria isolated from microbial mats from ten Antarctic lakes. *Systematic and Applied Microbiology*. **25**(4): 603-610.

Vasyurenko, Z. P. y Frolov, A. F. (1986). Fatty Acid Composition of Bacteria as a Chemotaxonomic Criterion. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology*, **30**(3): 287-293.

Vauterin, L., Yang, P., Hoste, B., Pot, B., Swings, J. y Kersters, K. (1992). Taxonomy of xanthomonads from cereals and grasses based on SDS-PAGE of proteins, fatty-acid analysis and DNA hybridization. *Journal of General Microbiology*, **138**: 1467-1477.

Vauterin, L., Hoste, B., Kersters, K. y Swings, J. (1995). Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **45**(3): 472-489.

Vauterin, L., Yang, P. y Swings, J. (1996). Utilization of fatty acid methyl esters for the differentiation of new *Xanthomonas* species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **46**(1): 298-304.

Verroken, A, Janssens M, Berhin C, Bogaerts P, Huang TD, Wauters G, Glupczynski Y. (2010). Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of *Nocardia* species. *Journal of Clinical Microbiology*, **48**(11):4015-4021.

Versalovic, J., Koeuth, T. y Lupski, J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, **19**(24): 6823-6831.

Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. y Lupski, J. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). *Methods in Molecular and Cellular Biology*, **5**(1), 25-40

Versalovic, J., de Bruijn, F. J. y Lupski, J. R. (1998a). Repetitive sequence-based PCR (rep-PCR) DNA fingerprinting of bacterial genomes. En *Bacterial Genomes*, pp. 437-454. Editado por de Bruijn, F. J.; Lupski, J. R.; Weinstock, G. M. Kluwer Academic Publishers.

Versalovic, J. y Lupski, J. R. (1998b). Interspersed repetitive sequences in bacterial genomes. En *Bacterial Genomes*, pp. 38-48. Editado por de Bruijn, F. J.; Lupski, J. R.; Weinstock, G. M. Kluwer. Academic Publishers.

Vesterlund, S., Paltta, J., Laukova, A., Karp, M. y Ouwehand, A. C. (2004). Rapid screening method for the detection of antimicrobial substances. *Journal of Microbiological Methods*, **57**: 23-31.

Vilella, D., Sánchez, M., Platas, G., Salazar, O., Genilloud, O., Royo, I., Cascales, C., Martín, I., Díez, T., Silverman, K. C., Lingham, R. B., Singh, S. B., Jayasuriya, H. y Peláez, F. (2000). Inhibitors of farnesylation of Ras from a microbial natural products screening program. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **25**(6): 315-327.

Vinuesa, P., Rademaker, J. L. W., de Bruijn, F. J. y Werner, D. (1998). Genotypic characterization of *Bradyrhizobium* strains nodulating endemic woody legumes of the Canary Islands by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of genes encoding 16S rRNA (16S rDNA) and 16S-23S rDNA intergenic spacers, repetitive extragenic palindromic PCR genomic fingerprinting, and partial 16S rDNA sequencing. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(6): 2096-2104.

Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Vandeleee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. y Zabeau, M. (1995). AFLP - a new technique for DNA-fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, **23**(21): 4407-4414.

Wagner-Döbler, I., Beil, W., Lang, S., Meiners, M. y Laatsch, H. (2002). Integrated approach to explore the potential of marine microorganisms for the production of bioactive metabolites. *Tools and Applications of Biochemical Engineering Science*, **74**: 207-238.

Walsh, C. (2003). Antibiotics: Actions, origins, resistance. Editado por C. Walsh. ASM Press. Washington, DC.

Walsh, C. T. y T. A. Wencewicz (2014). Prospects for new antibiotics: a molecule-centered perspective. *Journal of Antibiotics*, Japan Antibiotics Research Association. **67**: 7-22.

Wang, J., Soisson, S. M., Young, K., Shoop, W., Kodali, S., Galgoci, A., Painter, R., Parthasarathy, G., Tang, Y. S., Cummings, R., Ha, S., Dorso, K., Motyl, M., Jayasuriya, H., Ondeyka, J., Herath, K., Zhang, C. W., Hernandez, L., Allocco, J., Basilio, A., Tormo, J. R., Genilloud, O., Vicente, F., Pelaez, F., Colwell, L., Lee, S. H., Michael, B., Felcetto, T., Gill, C., Silver, L. L., Hermes, J. D., Bartizal, K., Barrett, J., Schmatz, D., Becker, J. W., Cully, D., Singh, S. B. (2006). Platensimycin is a selective FabF inhibitor with potent antibiotic properties. *Nature*, **441**: 358-361.

Watve, M., Tickoo, R., Jog, M. y Bhole, B. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Archives of Microbiology*, **176**: 386-390.

Wawrik, B., Kerkhof, L., Zylstra, G. J. y Kukor, J. J. (2005). Identification of unique type II polyketide synthase genes in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**(5): 2232-2238.

Wawrik, B., Kutliev, D., Abdivasieva, U. A., Kukor, J. J., Zylstra, G. J. y Kerkhof, L. (2007). Biogeography of actinomycete communities and type II polyketide synthase genes in soils collected in New Jersey and Central Asia. *Applied and Environmental Microbiology*, **73**(9): 2982-2989.

Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P. y Truper, H. G. (1987). Report of the *Ad Hoc* Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **37**(4): 463-464.

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A. y Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology*, **173**(2): 697-703.

Welch, D. F. (1991). Applications of cellular fatty-acid analysis. *Clinical Microbiology Reviews*, **4**(4): 422-438.

Welsh, J. y McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, **18**(24): 7213-7218.

Welsh, J. y McClelland, M. (1991). Genomic fingerprints produced by PCR with consensus transfer-RNA gene primers. *Nucleic Acids Research*, **19**(4): 861-866.

Welsh, J. y McClelland, M. (1992). PCR-amplified length polymorphisms in transfer-RNA intergenic spacers for categorizing Staphylococci. *Molecular Microbiology*, **6**(12): 1673-1680.

Whitaker, R. J., Grogan, D. W. y Taylor, J. W. (2003). Geographic barriers isolate endemic populations of hyperthermophilic archaea. *Science*, **301**(5635): 976-978.

Wiedmannalahmad, M., Tichy, H. V. y Schon, G. (1994). Characterization of *Acinetobacter* type strains and isolates obtained from waste-water treatment plants by PCR fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**(11): 4066-4071.

Willems, A., Pot, B., Falsen, E., Vandamme, P., Gillis, M., Kersters, K. y De Ley, J. (1991). Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Comamonas*: Relationship to *Aquaspirillum aquaticum*, E. Falsen group 10, and other clinical isolates. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **41**(3): 427-444.

Williams, S. T., Shameemullah, M., Watson, E. T. y Mayfield, C. I. (1972). Studies on the ecology of actinomycetes in soil-VI. The influence of moisture tension on growth and survival. *Soil Biology and Biochemistry*, **4**(2): 215-225.

Williams, S.T., Lanning, S. and Wellington, E.M.H. (1983a) Ecology of actinomycetes. En *The Biology of Actinomycetes*, pp. 481–528. Editado por Goodfellow, M., Mordarski, M. y Williams, S.T. Academic Press, London, UK.

Williams, S. T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E. M. H., Sneath, P. H. A. y Sackin, M. J. (1983b). Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *Journal of General Microbiology*, **129**: 1743-1813.

Williams, S. T., Goodfellow, M., Wellington, E. M. H., Vickers, J. C., Alderson, G., Sneath, P. H. A., Sackin, M. J. y Mortimer, A. M. (1983c). A probability matrix for identification of some streptomycetes. *Journal of General Microbiology*, **129**: 1815-1830.

Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A. y Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, **18**(22): 6531-6535.

Woese, C. R., Stackebrandt, E., Macke, T. J. y Fox, G. E. (1985). A phylogenetic definition of the major eubacterial taxa. *Systematic and Applied Microbiology*, **6**: 143-151.

Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **51**(2): 221-271.

Woese, C. R., Kandler, O. y Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**(12): 4576-4579.

Woese, C. R. (1992). Prokaryote systematics: the evolution of a science. En *The Prokaryotes Second Edition Vol 1*, pp. 3-18. Editado por A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer. Berlin: Springer-Verlag.

Woods, C. R., Versalovic, J., Koeuth, T. y Lupski, J. R. (1993). Whole-cell repetitive element sequence-based polymerase chain-reaction allows rapid assessment of clonal relationships of bacterial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, **31**(7): 1927-1931.

Xi, L., Ruan, J. y Huang, Y. (2012). Diversity and biosynthetic potential of culturable actinomycetes associated with marine sponges in the China Seas. *International Journal of Molecular Sciences*, **13**: 5917-5932.

Xin, Y., Kanagasabhapathy, M., Janussen, D., Xue, S. y Zhang, W. (2011). Phylogenetic diversity of Gram-positive bacteria cultured from Antarctic deep-sea sponges. *Polar Biology*, **34**: 1501-1512.

Yamaguchi, H., Uchida, K., Nagino, K. y Matsunaga, T. (2002). Usefulness of a colorimetric method for testing antifungal drug susceptibilities of *Aspergillus* species to voriconazole. *Journal of Infection and Chemotherapy*, **8**(4):374–377.

Yamamura, H., Hayakawa, M., Nakagawa, Y. y Limura, Y. (2004). Characterization of *Nocardia asteroides* isolates from different ecological habitats on the basis of repetitive extragenic palindromic-PCR fingerprinting. *Applied and Environmental Microbiology*, **70**(5): 3149-3151.

Yamamura, H., Ashizawa, H., Nakagawa, Y., Hamada, M., Ishida, Y., Otaguro, M., Tamura, T. y Hayakawa, M. (2011). *Actinomycetospora iriomotensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from a lichen sample. *Journal of Antibiotics*, **64**(4): 289-292.

Yang, P., Vauterin, L., Vancanneyt, M., Swings, J. y Kersters, K. (1993a). Application of fatty-acid methyl-esters for the taxonomic analysis of the genus *Xanthomonas*. *Systematic and Applied Microbiology*, **16**(1): 47-71.

Yang, X., Shimizu, Y., Steiner, J. R. y Clardy, J. (1993b). Nostoclides I and II, extracellular metabolites from a symbiotic cyanobacterium, *Nostoc* sp., from the lichen *Peltigera canina*. *Tetrahedron Letters*. **34**: 761-764.

Young, J. M. (2001). Implications of alternative classifications and horizontal gene transfer for bacterial taxonomy. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**(3): 945-953.

Zahn, J. A., Higgs, R. E. y Hilton, M. D. (2001). Use of direct-infusion electrospray mass spectrometry to guide empirical development of improved conditions for expression of secondary metabolites from actinomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**: 377-386.

Zak, J. C. y Willig, M. R. (2004). Analysis and interpretation of fungal biodiversity patterns. En *Biodiversity of Fungi: Inventory and Monitoring Methods*, pp. 59-76. Editado por G. M. Mueller, G. F. Bills y M. S. Foster. Elsevier Academic Press. Burlington, Massachusetts.

Zazopoulos, E., Huang, K., Staffa, A., Liu, W., Bachmann, B. O., Nonaka, K., Ahlert, J., Thorson, J. S., Shen, B. y Farnet, C. M. (2003). A genomics-guided approach for discovering and expressing cryptic metabolic pathways. *Nature Biotechnology*, **21**: 187-90.

Zeigler, D. R. (2003). Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. **53**: 1893-1900.

Zenova, G. M., Rydikina, E. B. y Kalakutskii, L. V. (1983). Growth and antimicrobial activity of an association of an actinomycete and a green alga. *Nauchnye Doki Vyss Shkoly Biol Nauki*, pp. 81-85.

Zhang, Z., Schwartz, S., Wagner, L. y Miller, W. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*, **7**(1-2): 203-214.

Zhang, Z., Kudo, T., Nakajima, Y. y Wang, Y. (2001). Clarification of the relationship between the members of the family *Thermomonosporaceae* on the basis of 16S rDNA, 16S-23S rRNA internal transcribed spacer and 23S rDNA sequences and chemotaxonomic analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **51**(2): 373-383.

Zhang, C., Ondeyka, J. G., Zink, D. L., Basilio, A., Vicente, F., Salazar, O., Genilloud, O., Dorso, K., Motyl, M., Byrne, K. y Singh, S. B. (2009a). Discovery of okilactomycin and congeners from *Streptomyces scabrisporus* by antisense differential sensitivity assay targeting ribosomal protein S4. *Journal of Antibiotics*, **62**(2): 55-61.

Zhang, W., Zhang, F., Li, Z., Miao, X., Meng, Q. y Zhang, X. (2009b). Investigation of bacteria with polyketide synthase genes and antimicrobial activity isolated from South China Sea sponges. *Journal of Applied Microbiology*, **107**(2): 567-575.

Zook, P. D. (1983) A study of the role of bacteria in lichens. M.A. thesis). Clark University, Worcester, MA.

Zucchi, T., Bonda, A., Frank, S., Kim, B.-Y., Kshetrimayum, J. y Goodfellow, M. (2012). *Amycolatopsis bartoniae* sp. nov. and *Amycolatopsis bullii* sp. nov., mesophilic actinomycetes isolated from arid Australian soils. *Antonie van Leeuwenhoek*, **102**: 91-98.

Direcciones de páginas Web consultadas:

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool): <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

EzTaxon server: <http://www.eztaxon.org/> (Chun et al., 2007)

EzBiocloud server: <http://www.ezbiocloud.net/eztaxon> (Kim et al., 2012)

LPSN (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature): <http://www.bacterio.cict.fr/>

NCBI (National Center for Biotechnology Information): <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

National Center for Biotechnology Information: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>

European Molecular Biology Laboratory: <http://www.ebi.ac.uk/genomes/>

Genomes Online Database: <http://www.genomesonline.org>

_____Glosario de Tablas y Figuras____

8. GLOSARIO DE TABLAS Y FIGURAS.

Tablas	Página
Tabla 1. Productos naturales producidos por actinomicetos, comercializados o en desarrollo para su uso en medicina o veterinaria.	11
Tabla 2. Patrones de ácidos grasos entre los miembros de la clase “ <i>Actinobacteria</i> ”.	32
Tabla 3. Métodos de caracterización genotípica según su capacidad para distinguir géneros/especies o subespecies/cepas.	46
Tabla 4. Resumen de los diferentes métodos para calcular las relaciones filogenéticas y para la construcción de árboles filogenéticos.	61
Tabla 5. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para el análisis de PCR- <i>fingerprinting</i> .	74
Tabla 6. Volúmenes empleados para cada análisis de PCR- <i>fingerprinting</i> .	75
Tabla 7. Parámetros de amplificación empleados para cada análisis de PCR- <i>fingerprinting</i> .	75
Tabla 8. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para la detección de secuencias específicas de genes biosintéticos.	77
Tabla 9. Volúmenes empleados para la detección de secuencias específicas de genes biosintéticos.	77
Tabla 10. Parámetros de amplificación empleados para la detección de secuencias específicas de genes biosintéticos.	78
Tabla 11. Cepas tipo cuyas secuencias, obtenidas de GenBank, se han utilizado en este trabajo para el análisis filogenético.	80
Tabla 12. Líquenes utilizados para el aislamiento de actinomicetos según su origen geográfico, tipo de sustrato y número de cultivos seleccionados de cada uno de ellos.	101
Tabla 13. Distribución de cepas aisladas de líquenes procedentes de cada entorno geográfico y nicho ecológico.	103
Tabla 14. Número de cepas aisladas de cada grupo taxonómico establecido según el método empleado y según el tratamiento con antibiótico usado.	104
Tabla 15. Ácidos grasos diagnóstico y mayoritarios presentes en las cepas analizadas.	111

Tabla 16. Asignación de especies a los 222 cultivos secuenciados según el resultado del análisis de EzTaxon y distribución de las especies identificadas según sus lugares de aislamiento.	113
Tabla 17. Rangos de los valores de similitud interespecíficos para cada uno de los géneros.	118
Tabla 18. Diversidad de las cepas según el número de OTUs encontradas y el número de cepas asignadas a cada grupo taxonómico, así como el número promedio de cepas encontradas en cada OTU.	128
Tabla 19. Porcentaje de cepas analizadas con cada una de las técnicas empleadas.	195
Tabla 20. Estimación de la diversidad de las cepas para cada técnica empleada según el número de cepas analizado, junto con el número de OTUs o <i>riqueza</i> (S) y el número de cepas promedio esperado para cada OTU (N_e).	198
Tabla 21. Estimación de la diversidad de las cepas para cada técnica empleada según los índices de diversidad de Simpson (D) y de Shannon-Weiner (H').	198
Tabla 22. Número de cepas ensayadas y número de cepas en las que se detectan sistemas biosintéticos PKS-I, PKS-II, NRPS, APH y HMG.	202
Tabla 23. Actividades antimicrobianas detectadas en función de la taxonomía de los cultivos para cada cepa de ensayo y según su origen geográfico.	212
Tabla 24. Detección de sistemas biosintéticos en la población de actinomicetos agrupados según su capacidad para producir actividades antimicrobianas.	215
Tabla 25. Resumen de las actividades detectadas en las fermentaciones de 7 días, en medios sólidos y líquidos y 14 días, en medios sólidos y líquidos.	221
Tabla 25a. Actividades detectadas para cada cultivo crecido en medio sólido a 7 días de incubación.	222
Tabla 25b. Actividades detectadas para cada cultivo crecido en medio sólido a 14 días de incubación.	224
Tabla 25c. Actividades detectadas para cada cultivo crecido en medio líquido a 7 días de incubación.	226
Tabla 25d. Actividades detectadas para cada cultivo crecido en medio líquido a 14 días de incubación.	228
Tabla 26. Número total de actividades para cada medio y para los dos tiempos de incubación.	230
Tabla 27. Resumen de las actividades de las cepas de <i>Pseudonocardia</i>	

ensayadas en las microfermentaciones y en el ensayo con tacos de agar, junto con la detección de ruta(s) biosintética(s) y análisis de LC-MS. 234

Tabla 28. Cultivos que presentan algún caldo activo junto con las actividades detectadas, tanto inicialmente en el taco como en la posterior fermentación así como el (los) compuesto(s) detectados por LC/MS y la detección de rutas biosintéticas PKS-I, PKS-II y NRPS. 236

Figuras	Página
---------	--------

Figura 1. Representación esquemática de varios componentes celulares y técnicas con información fenotípica y genotípica utilizadas en una aproximación polifásica.	56
---	----

Figura 2. Nivel de resolución taxonómica de diferentes técnicas de caracterización.	57
--	----

Figura 3. Localización geográfica de las zonas de muestreo de los líquenes.	65
--	----

Figura 4. Preparación e inoculación de las cepas seleccionadas en diferentes medios mediante el “sistema Duetz”.	83
---	----

Figura 5. Placas Duetz después de la fermentación en medios líquidos.	84
--	----

Figura 6. Placas multipocillo después de la fermentación en medio sólido.	88
--	----

Figura 7. Diversidad de los cultivos en base a la composición en ácidos grasos.	104
--	-----

Figura 8. Árbol filogenético con las ramas colapsadas obtenido mediante el método de Neighbour Joining (NJ) basado en las secuencias parciales del gen 16S ARNr de las 222 cepas salvajes y de las 82 cepas tipo incluidas en el estudio.	116
--	-----

Figura 8a. Árbol filogenético de las 109 cepas de <i>Streptomyces</i> spp. y de las 54 cepas tipo incluidas en el estudio.	117
---	-----

Figura 8b. Árbol filogenético de las 71 cepas de la familia <i>Micromonosporaceae</i> y de las 12 cepas tipo incluidas en el estudio.	120
--	-----

Figura 8c. Árbol filogenético de las 33 cepas de la familia <i>Pseudonocardiaceae</i> y de las 11 cepas tipo incluidas en el estudio.	123
--	-----

Figura 8d. Árbol filogenético de las 9 cepas de las familias <i>Nocardiaceae</i> (4), <i>Thermomonosporaceae</i> (3) y <i>Strptosporangiaceae</i> (2) y de las 5 cepas tipo incluidas en el estudio.	124
---	-----

Figura 9. Dendrograma de las cepas de <i>Streptomyces</i> resultante del análisis	
--	--

de IGS 16S-23S.	129
Figura 10. Dendrograma de las cepas de <i>Streptomyces</i> resultante del análisis de tADN-PCR.	132
Figura 11. Dendrograma de las cepas de <i>Streptomyces</i> resultante del análisis de BOX-PCR.	135
Figura 12. Dendrograma de las cepas de <i>Streptomyces</i> resultante del análisis de ERIC-PCR.	139
Figura 13. Dendrograma de las cepas de <i>Streptomyces</i> resultante del análisis de REP-PCR.	143
Figura 14. Dendrograma de las cepas de <i>Streptomyces</i> resultante del análisis de (GTG) ₅ -PCR.	146
Figura 15. Dendrograma de las cepas de la familia <i>Micromonosporaceae</i> resultante del análisis de IGS 16S-23S.	150
Figura 16. Dendrograma de las cepas de la familia <i>Micromonosporaceae</i> resultante del análisis de tADN-PCR.	155
Figura 17. Dendrograma de las cepas de la familia <i>Micromonosporaceae</i> resultante del análisis de BOX-PCR.	159
Figura 18. Dendrograma de las cepas de la familia <i>Micromonosporaceae</i> resultante del análisis de ERIC-PCR.	164
Figura 19. Dendrograma de las cepas de la familia <i>Micromonosporaceae</i> resultante del análisis de REP-PCR.	169
Figura 20. Dendrograma de las cepas de la familia <i>Micromonosporaceae</i> resultante del análisis de (GTG) ₅ -PCR.	174
Figura 21. Dendrograma de las cepas de la familia <i>Pseudonocardiaceae</i> resultante del análisis de tADN-PCR.	179
Figura 22. Dendrograma de las cepas de la familia <i>Pseudonocardiaceae</i> resultante del análisis de BOX-PCR.	181
Figura 23. Dendrograma de las cepas de la familia <i>Pseudonocardiaceae</i> resultante del análisis de ERIC-PCR.	183
Figura 24. Dendrograma de las cepas de la familia <i>Pseudonocardiaceae</i> resultante del análisis de REP-PCR.	185
Figura 25. Dendrograma de las cepas de la familia <i>Pseudonocardiaceae</i> resultante del análisis de (GTG) ₅ -PCR.	187
Figura 26. Matriz con los porcentajes de concordancia entre las técnicas empleadas	

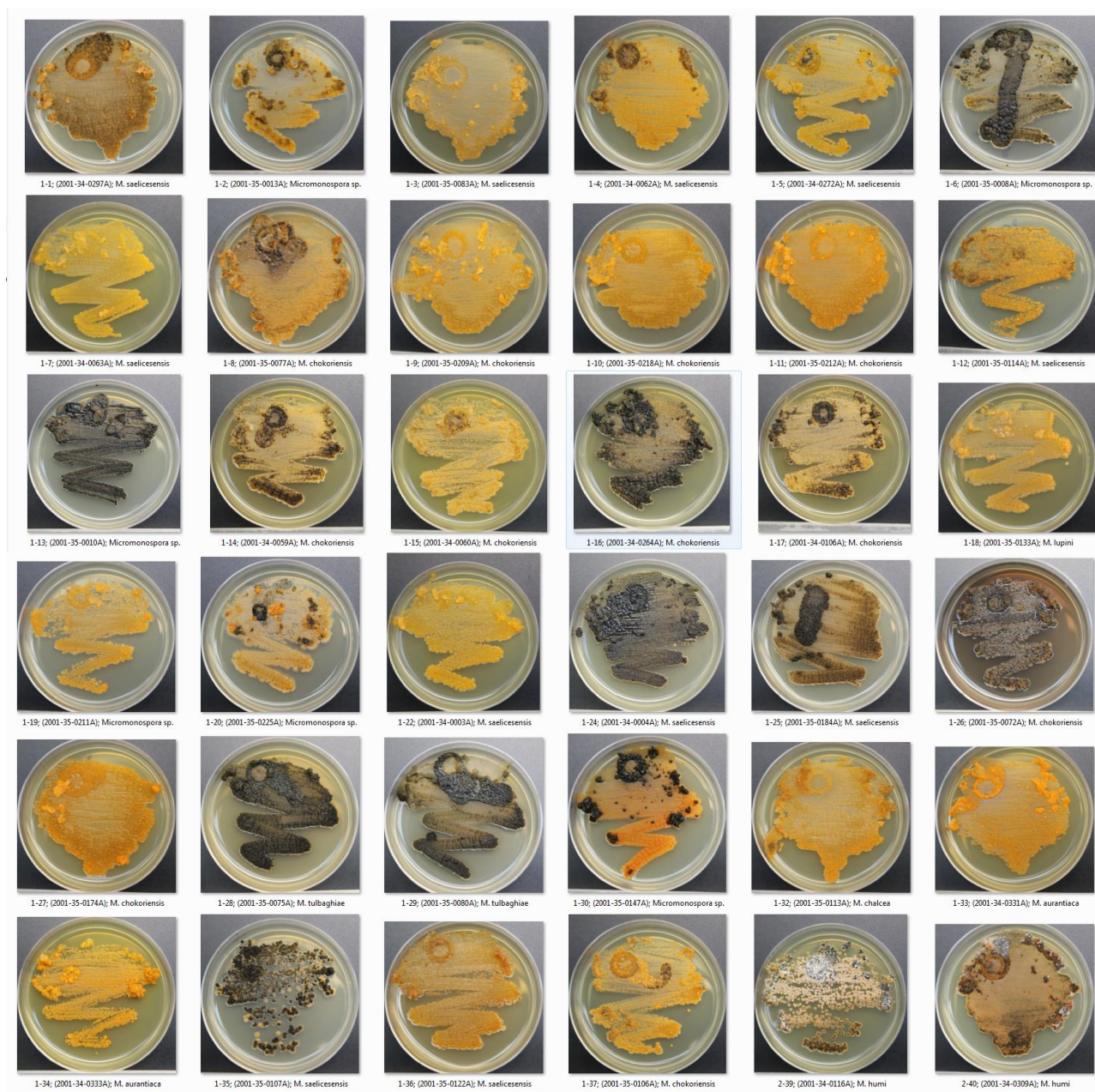
para el conjunto de cepas estudiadas junto con el dendrograma resultante de dicha matriz.	188
Figura 27. Matriz con los porcentajes de concordancia entre las técnicas empleadas para las cepas del género <i>Streptomyces</i> junto con el dendrograma resultante de dicha matriz.	189
Figura 28. Matriz con los porcentajes de concordancia entre las técnicas empleadas para las cepas de la familia <i>Micromonosporaceae</i> junto con el dendrograma resultante de dicha matriz.	190
Figura 29. Matriz con los porcentajes de concordancia entre las técnicas empleadas para las cepas de la familia <i>Pseudonocardaceae</i> junto con el dendrograma resultante de dicha matriz.	190
Figura 30. Dendrograma resultante de la combinación de los tres perfiles de restricción con la enzima <i>Hin</i> F1 de las cepas de <i>Streptomyces</i> .	202
Figura 31. Dendrograma resultante de la combinación de los tres perfiles de restricción con la enzima <i>Hin</i> F1 de las cepas de la familia <i>Micromonosporaceae</i> .	204
Figura 32. Dendrograma resultante de la combinación de los tres perfiles de restricción con la enzima <i>Hin</i> F1 de las cepas de la familia <i>Pseudonocardaceae</i> .	206

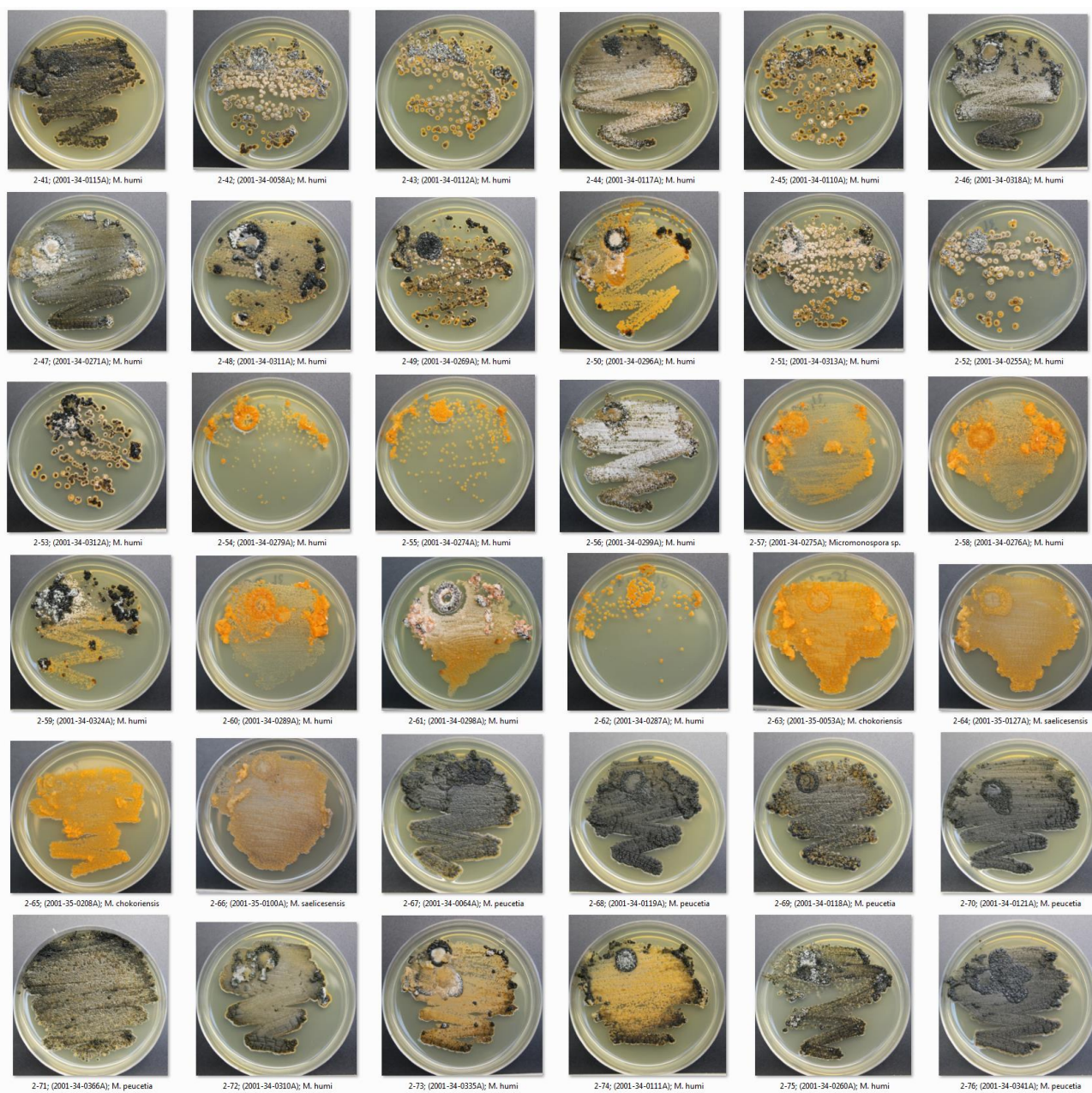
Gráficas	Página
-----------------	---------------

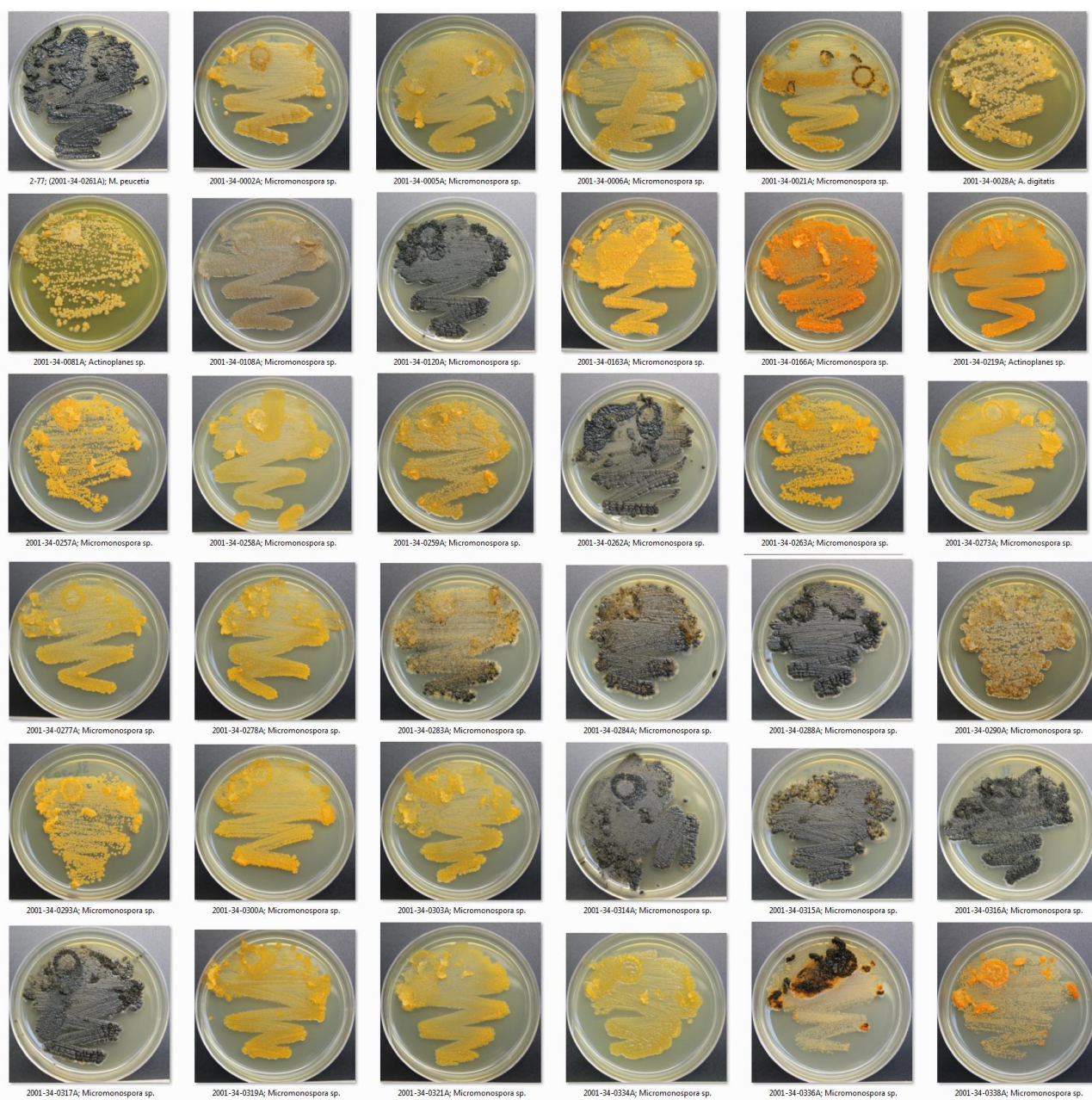
Gráfica 1. Número de caldos activos obtenidos en función del tipo de fermentación y los tiempos de incubación.	219
Gráfica 2. Número total de actividades por medios para cada una de las condiciones de fermentación.	232
Gráfica 3. Curva de actividades acumuladas según las actividades únicas de cada medio.	232

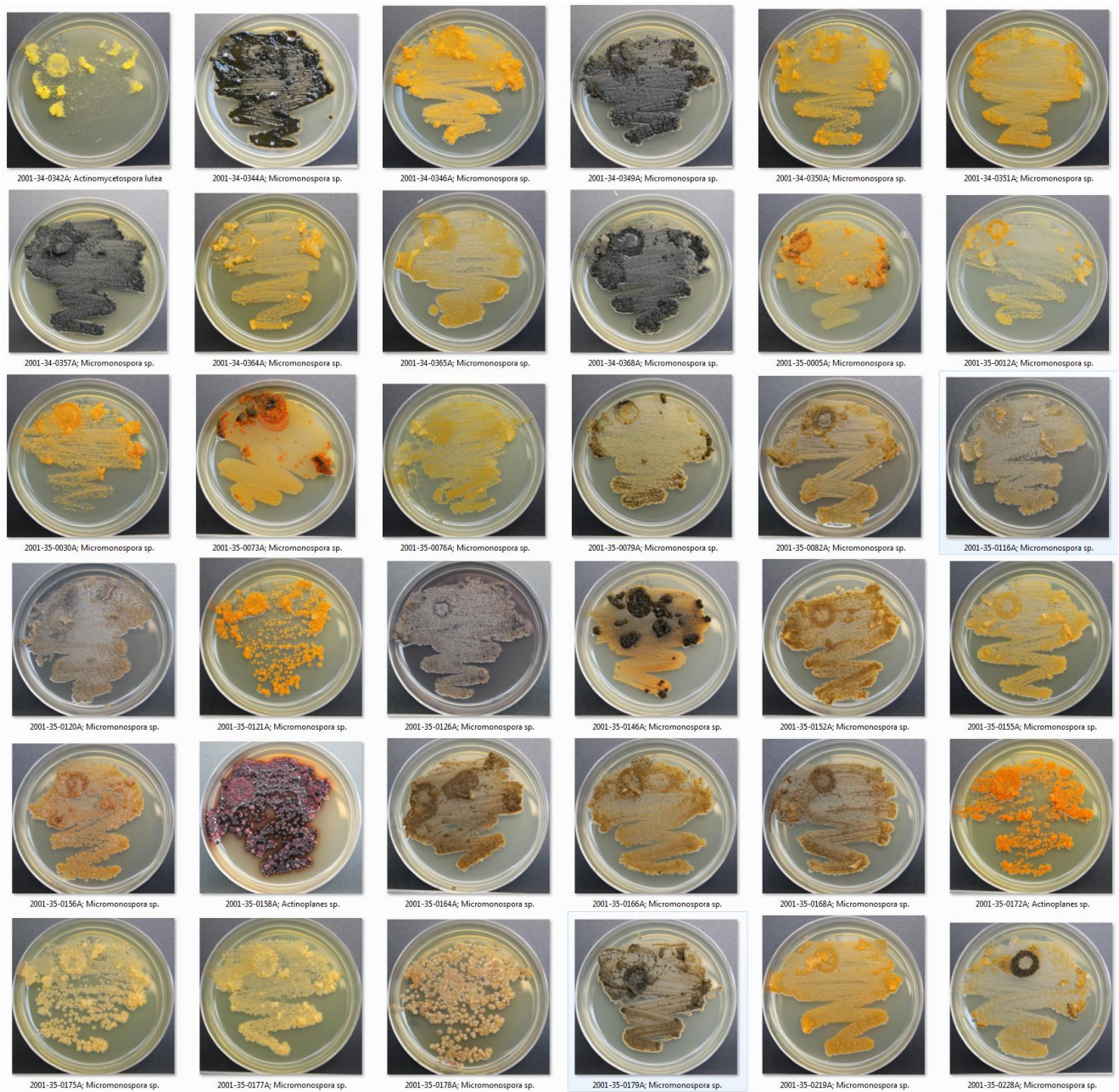
Anexos

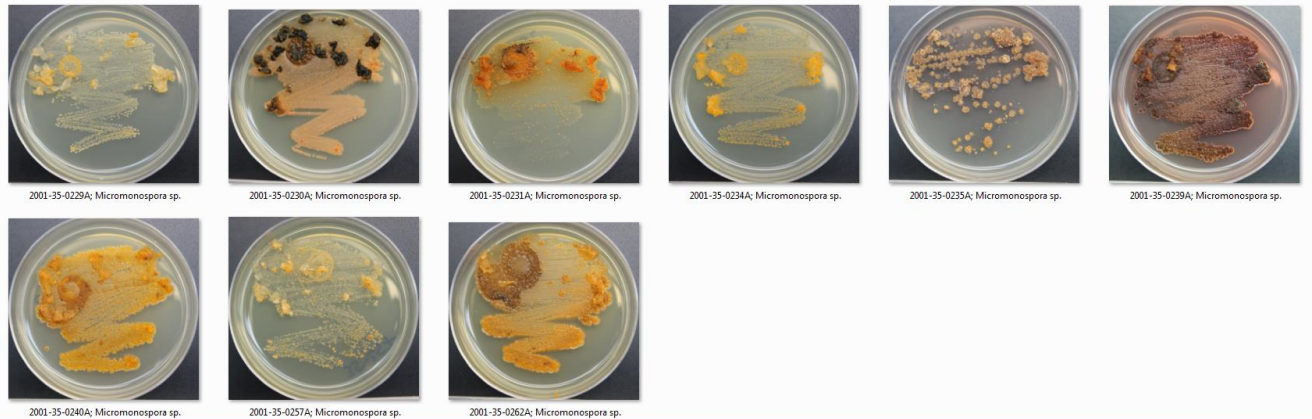
9.1. Anexo 1:

Micromonosporaceae

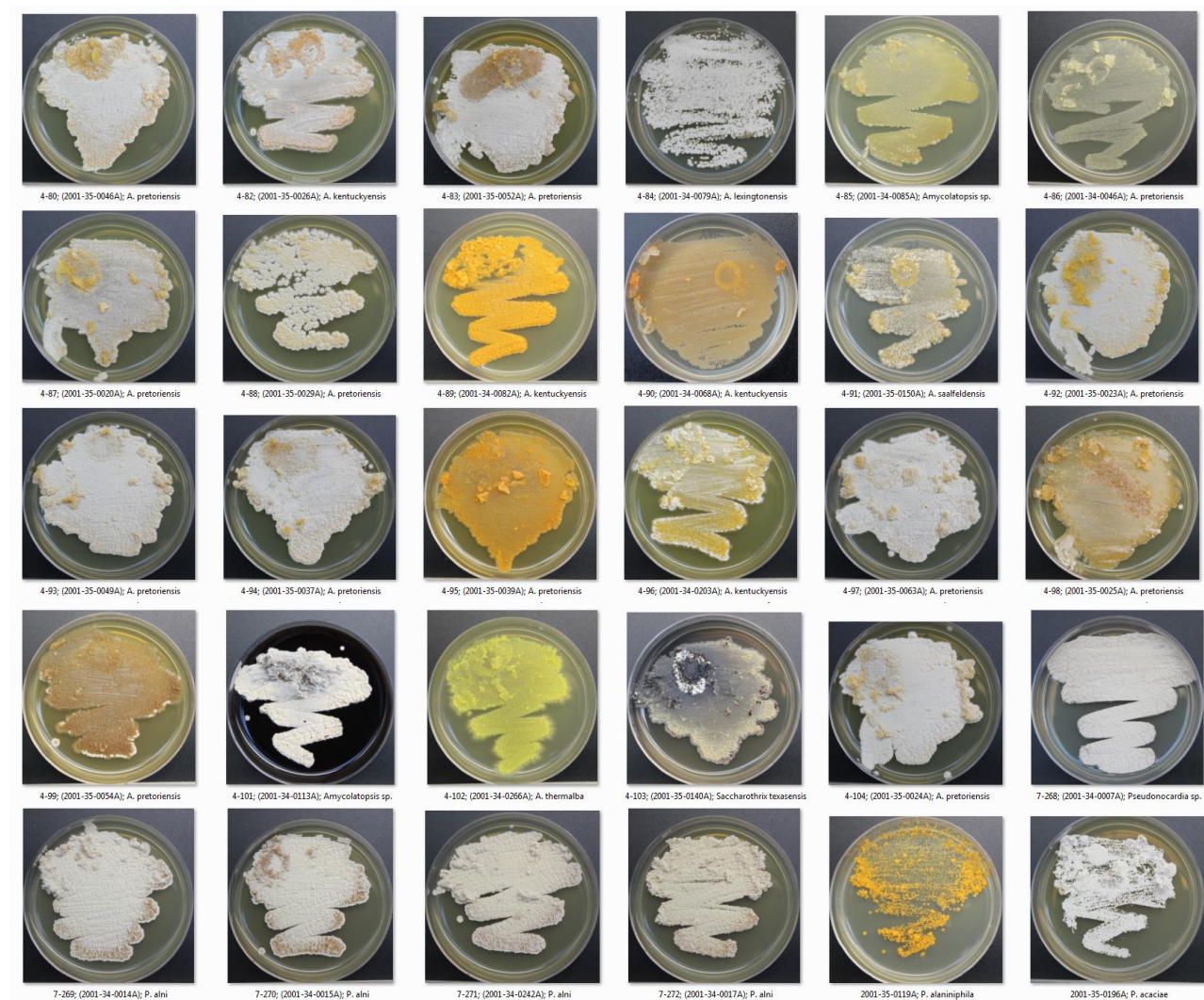


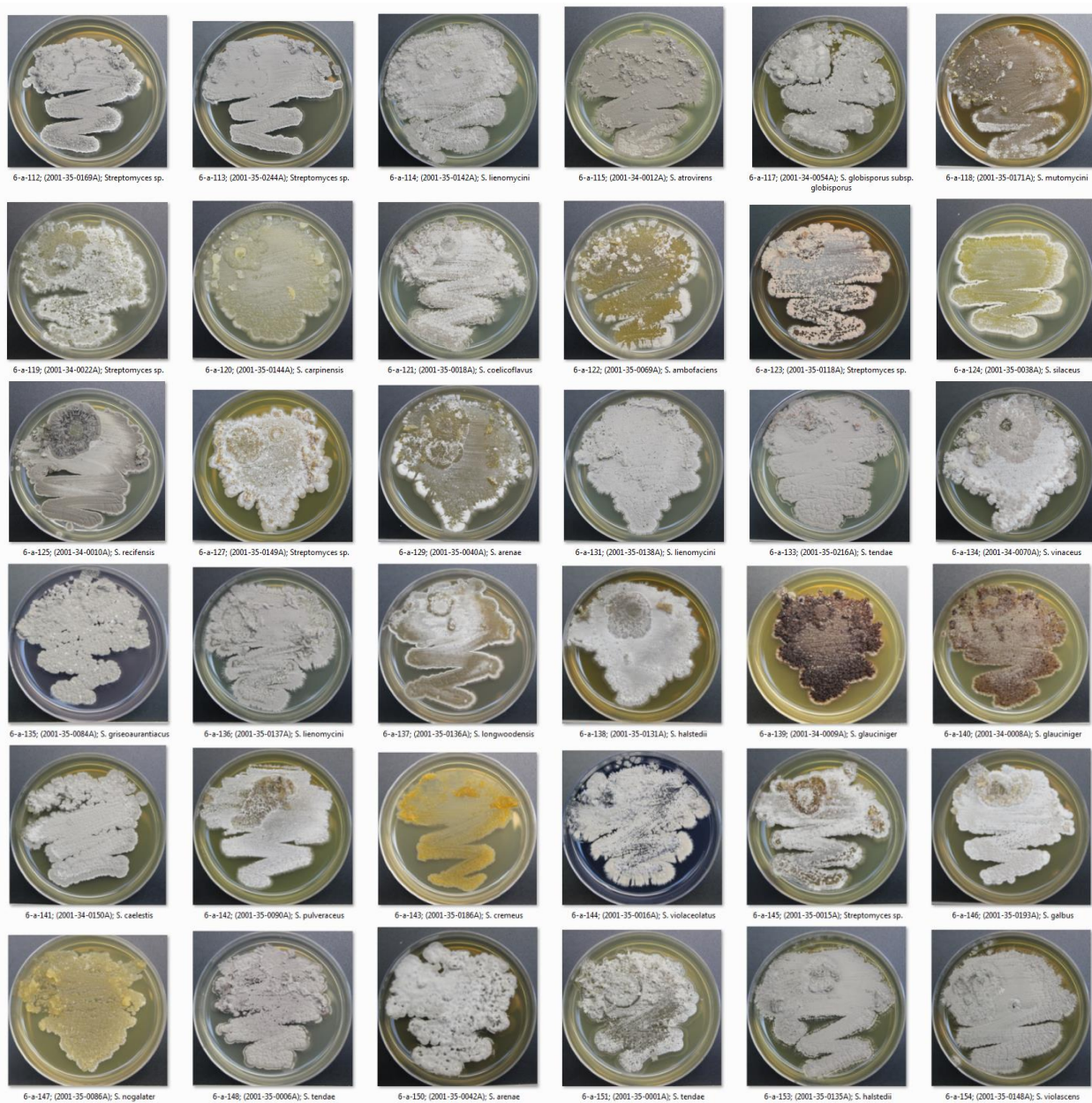






Pseudonocardiaceae



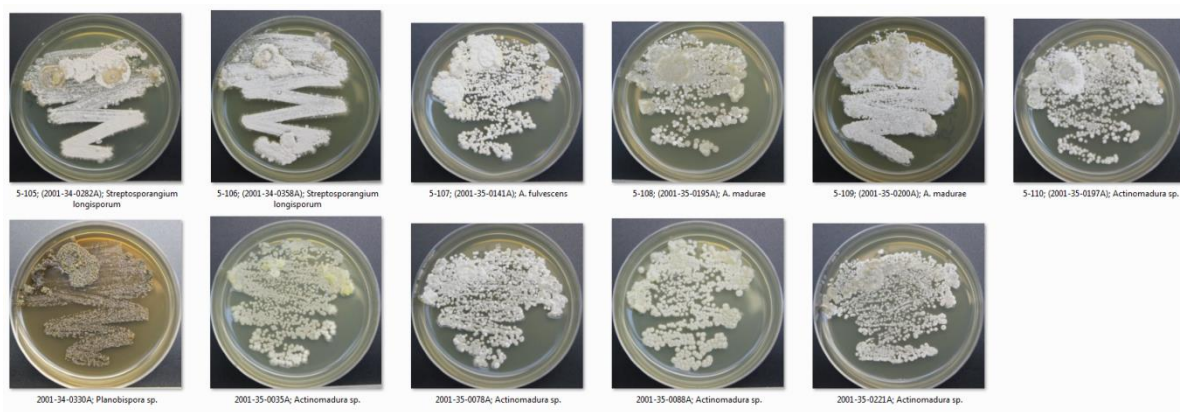
Streptomyces



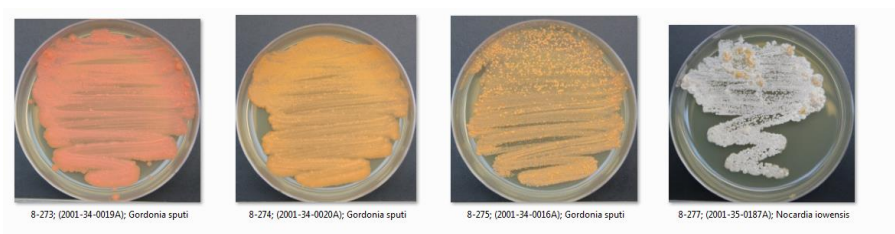




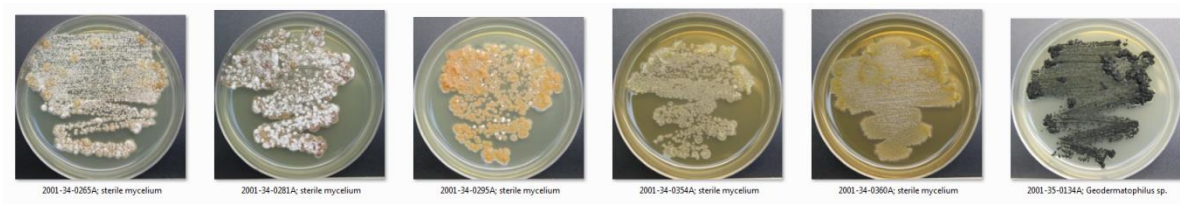
Thermomonosporaceae / Streptosporangiaceae



Gordoniaceae / Nocardiaceae



Micelios estériles y Geodermatophilaceae



9.2. Anexo 2: Nomenclatura de los ácidos grasos utilizados para su clasificación según la IUPAC.

Saturados	
15:00	ácido pentadecanoico
16:00	ácido hexadecanoico (palmítico)
17:00	ácido heptadecanoico
18:00	ácido octadecanoico (esteárico)
Insaturados	
16:1 ω 7c	ácido cis-9 hexadecenoico (palmitoleico)
17:1 ω 8c	ácido cis-9 heptadecenoico
18:1 ω 9c	ácido cis-9 octadecenoico (oleico)
Ramificados tipo iso	
14:0 iso	ácido 12-metil tridecanoico
15:0 iso	ácido 13-metil tetradecanoico
16:0 iso	ácido 14-metil pentadecanoico
16:1 iso H	ácido 14-metil pentadecenoico con un doble enlace en una posición desconocida denominada H
17:0 iso	ácido 15-metil hexadecanoico
17:1 iso C	ácido 15-metil hexadecenoico con un doble enlace en una posición desconocida denominada C
Ramificados tipo anteiso	
15:0 anteiso	ácido 12-metil tetradecanoico
17:0 anteiso	ácido 14-metil hexadecanoico
Ramificados tipo 10-metilo	
10-metil 16:0	ácido 10-metil hexadecanoico
10-metil 17:0	ácido 10-metil heptadecanoico
10-metil 17:0 iso	ácido 10-metil, 15-metil hexadecanoico
10-metil 18:0	ácido 10-metil octadecanoico (tuberculoesteárico)
Hidroxilados	
16:0 2OH	ácido 2-hidroxi hexadecanoico
16:0 iso 2OH	ácido 2-hidroxi-14-metil pentadecanoico
17:0 iso 2OH	ácido 2-hidroxi-15-metil hexadecanoico
Otros	
17:0 cyclo	ácido cis-9,10-metilenehexadecanoico
MEZCLA DE ACIDOS GRASOS TIPO 4	mezcla de 2 ácidos grasos: 2OH 15:0 iso (ácido 2-hidroxi-14-metil tetradecanoico) y 16:1 ω 7t (ácido trans-9 hexadecenoico) que no pueden resolverse usando las condiciones cromatográficas del sistema MIDI.

9.3. Anexo 3: Ácidos grasos mayoritarios de los cultivos analizados por FAMES en cada *cluster*.

Ácidos grasos mayoritarios de los cultivos agrupados en el *cluster* 1

Cultivo	Taxonomía inicial	Origen	Cluster	15:0	15:0 ANTEISO	15:0 ISO	16:0 ISO	17:0	17:0 10METHYL	17:0 ANTEISO	17:0 ISO	17:1 ANTEISO C	17:1 CIS 9	17:1 ISO C	18:1 CIS 9	TBSA 18:0 10METHYL
2001-34-0297A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	1	3,23	6,03	29,35	13,25	3,60	18,43	5,52	2,39	0,78	7,29	4,64	0,42	0,77
2001-35-0013A	<i>Micromonospora</i>	HAWAI	1	1,46	3,69	30,88	15,63	3,01	25,56	4,15	2,65	0,48	5,98	3,52	0	0
2001-35-0083A	<i>Micromonospora</i>	HAWAI	1	0,65	2,11	34,05	8,27	4,51	18,98	4,12	4,96	0,92	5,48	9,02	0,70	1,11
2001-34-0062A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	1	6,05	9,24	36,63	8,01	4,76	14,81	3,13	1,44	0,71	7,97	3,00	0	0,38
2001-34-0272A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	1	4,28	8,19	34,94	8,62	5,89	17,14	3,74	1,96	0,55	7,59	2,98	0	0,44
2001-35-0008A	<i>Micromonospora</i>	HAWAI	1	2,99	6,51	37,53	11,27	4,62	11,34	2,75	3,35	0,37	10,16	4,62	0,50	0,57
2001-34-0063A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	1	6,73	8,50	30,75	7,56	7,09	19,52	3,50	1,63	0,61	8,64	2,56	0	0,50
2001-35-0077A	<i>Micromonospora</i>	HAWAI	1	4,50	5,27	31,85	7,54	4,92	23,95	3,24	2,58	0	9,31	2,16	0,35	0,60
2001-35-0209A	<i>Micromonospora</i>	HAWAI	1	4,11	6,02	37,69	7,73	3,50	13,46	2,20	1,88	0	17,07	2,71	0,40	0
2001-35-0218A	<i>Micromonospora</i>	HAWAI	1	4,98	5,47	37,23	8,23	3,60	12,72	2,11	1,68	0	15,62	2,96	0	0
2001-35-0212A	<i>Micromonospora</i>	HAWAI	1	4,51	5,90	34,34	7,22	3,94	18,80	2,36	1,85	0	15,71	2,25	0,39	0
2001-35-0114A	<i>Micromonospora</i>	HAWAI	1	10,98	6,91	31,59	6,74	3,22	16,14	1,81	0,91	0	16,11	1,57	0	0
2001-35-0010A	<i>Micromonospora</i>	HAWAI	1	3,74	3,86	26,33	7,83	5,35	30,29	3,58	2,85	0	7,36	1,93	0,38	1,26
2001-34-0059A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	1	1,29	8,32	34,60	9,39	0,77	0,89	3,89	1,59	2,31	22,40	9,19	0,66	0
2001-34-0060A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	1	1,55	8,63	34,90	9,05	0,98	0,81	3,57	1,62	2,48	22,16	9,09	0,66	0
2001-34-0264A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	1	2,84	9,06	31,93	9,09	1,73	1,09	3,39	1,51	1,39	25,22	6,09	1,08	0
2001-34-0106A	micelio estéril	REUNIÓN	1	2,05	7,63	40	6,81	0,69	0,89	2,40	1,23	1,73	22,95	7,91	0,40	0
2001-35-0133A	micelio estéril	HAWAI	1	3,20	5,03	38,62	6,23	1,68	4,13	3,50	1,69	1,25	23,41	7,31	0,64	0
2001-35-0211A	<i>Micromonospora</i>	HAWAI	1	4,09	7,19	39,34	6,27	3,19	8,95	2,03	1,74	0,33	20,42	2,32	0,39	0
2001-35-0225A	<i>Micromonospora</i>	HAWAI	1	2,15	7,46	38,32	7,71	3,65	6,86	4,23	2,66	0,48	21,03	3,15	0,64	0
2001-34-0241A	<i>Micromonospora</i>	ALASKA	1	3,61	1,35	28,38	9,33	4,51	6,78	1,78	6,42	0	19,47	8,18	2,67	0,82
2001-34-0003A	<i>Micromonospora</i>	ALASKA	1	0,56	5,40	36,08	4,37	1,58	8,27	10,73	6,98	1,30	10,89	9,80	1,27	0,90
2001-35-0170A	<i>Micromonospora</i>	HAWAI	1	1,23	6,27	36,33	2,40	3,39	8,21	7,03	5,73	1,18	11,63	9,86	1,28	0,73

Cultivo	Taxonomía inicial	Origen	Cluster	15:0	15:0 ANTEISO	15:0 ISO	16:0 ISO	17:0	17:0 10METHYL	17:0 ANTEISO	17:0 ISO	17:1 ANTEISO C	17:1 CIS 9	17:1 ISO C	18:1 CIS 9	TBSA 18:0 10METHYL
2001-34-0004A	<i>Micromonospora</i>	ALASKA	1	1,62	8,14	32,94	4,81	3,03	10,77	8,25	3,70	1,64	14,16	7,35	1,00	0,66
2001-35-0184A	<i>Micromonospora</i>	HAWAI	1	1,12	4,56	31,30	2,65	4,56	13,66	9,11	7,36	1,21	9,90	9,44	1,51	2,11
2001-35-0072A	<i>Micromonospora</i>	HAWAI	1	1,01	3,69	40,10	3,53	2,52	7,68	2,96	6,57	0,60	13,72	12,91	0,98	0,70
2001-35-0174A	<i>Micromonospora</i>	HAWAI	1	0,71	4,93	37,94	2,80	2,58	5,06	6,67	6,37	1,44	11,91	12,86	2,97	1,43
2001-35-0075A	micelio estéril	HAWAI	1	0,35	7,07	22,44	10,13	2,54	3,99	14,33	6,73	2,19	7,18	15,20	2,50	1,25
2001-35-0080A	<i>Micromonospora</i>	HAWAI	1	0,74	8,70	26,61	9,57	2,33	3,85	11,95	5,69	2,22	7,21	13,57	1,82	1,13
2001-35-0147A	<i>Micromonospora</i>	HAWAI	1	0,40	6,99	30,21	12,95	2,77	2,21	9,89	9,54	2,49	6,76	12,16	0,73	0
2001-35-0017A	<i>Micromonospora</i>	HAWAI	1	0,55	2,68	28,99	9,44	6,72	7,01	6,61	8,95	1,07	8,88	13,44	0,77	0,90
2001-35-0113A	<i>Micromonospora</i>	HAWAI	1	0	6,85	29,13	3,95	1,06	0,75	11,59	8,13	3,42	4,47	25,21	3,03	0,24
2001-34-0331A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	1	0,96	1,69	20,50	20,80	1,83	4,88	8,86	4,82	2,36	7,72	16,31	0,93	0,64
2001-34-0333A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	1	0,81	1,71	19,30	26,83	2,07	5,30	9,46	6,21	1,92	5,89	13,15	1,02	0,64
2001-35-0107A	<i>Micromonospora</i>	HAWAI	1	0	4,71	49,60	1,73	1,52	1,01	2,47	6,13	1,39	7,48	21,43	1,09	0
2001-35-0122A	micelio estéril	HAWAI	1	0,52	3,47	47,88	2,56	1,94	3,54	5,02	7,86	1,29	5,26	14,91	1,65	1,12
2001-35-0106A	<i>Micromonospora</i>	HAWAI	1	5,11	5,99	33,51	6,61	2,98	3,36	1,97	1,51	0	33,11	3,79	0	0
2001-35-0250A	<i>Micromonospora</i>	HAWAI	1	10,35	6,10	23,85	8,25	3,16	3,67	1,08	0,70	0	35,30	2,00	0,49	0
MEDIA				2,92	5,82	33,32	8,29	3,21	9,60	5,13	3,99	1,38	13,50	8,17	1,07	0,86
MIN				0	1,35	19,30	1,73	0,69	0,75	1,08	0,70	0	4,47	1,57	0	0
MAX				10,98	9,24	49,60	26,83	7,09	30,29	14,33	9,54	3,42	35,30	25,21	3,03	2,11
% cultivos				94,74	100	100	100	100	100	100	100	76,32	100	100	81,58	57,89

Ácidos grasos mayoritarios de los cultivos agrupados en el *cluster* 2.

Cultivo	Taxonomía inicial	Origen	Cluster	14:0 ISO	15:0	15:0 ANTEISO	15:0 ISO	16:0	16:0 ISO	16:1 CIS 9	16:1 ISO F	16:1 ISO H	17:0	17:0 10METHYL	17:0 ANTEISO	17:0 ISO	17:1 CIS 9	17:1 ISO C	18:1 CIS 9	TBSA 18:0 10METHYL
2001-34-0116A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	1,35	3,26	6,26	24,61	0,92	21,21	0,42	0,64	0,75	4,65	14,83	3,44	1,68	10,72	2,85	0,55	0,74
2001-34-0309A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	1,86	3,23	7,60	23,17	0,74	22,38	0,40	0,71	1,29	3,69	11,88	2,84	1,80	11,56	2,86	0,49	0,55
2001-34-0115A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	1,56	3,19	8,49	23,37	0,63	22,82	0,27	0,61	1,01	3,31	11,35	3,45	1,33	8,80	2,12	0,40	0,66
2001-34-0058A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	1,73	4,14	5,71	25,47	1,17	22,73	0	0,83	1,10	5,02	13,18	2,28	1,64	11,33	0	0	0
2001-34-0112A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	1,59	3,97	5,43	24,88	1,21	22,51	0,59	0,66	0,90	4,83	14,14	2,17	1,32	10,91	0	0,45	0,57
2001-34-0117A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	1,67	3,71	7,11	24,18	0,61	23,26	0	0,79	0,78	5,24	14,63	3,15	1,38	11,24	0	0	0
2001-34-0110A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	1,42	3,46	6,30	22,49	0,86	22,38	0,45	0,56	0,80	5,77	15,38	3,13	1,62	10,45	0	0,51	0,65
2001-34-0318A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	1,57	3,55	6,73	21,16	0,65	22,68	0,34	0,62	0,96	4,85	16,11	2,99	1,26	11,68	0	0,32	0,49
2001-34-0271A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	1,81	3,63	7,09	20,39	1,04	23,61	0	0,50	0,98	6,52	13,92	2,79	1,90	11,22	2,75	0,49	0,51
2001-34-0311A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	2,11	3,20	7,24	19,32	0,51	26,53	0,36	0,55	1,47	4,03	13,23	2,71	1,10	11,62	2,18	0,37	0,37
2001-34-0269A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	1,82	2,52	7,25	17,47	0,70	26,37	0,34	0,76	0,52	7,33	14,46	4,23	1,79	7,99	0	0,45	0,58
2001-34-0296A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	1,08	2,13	4,08	19,05	0,83	25,79	0	0,64	0,98	5,40	16,65	3,79	2,38	9,66	0	0,88	1,02
2001-34-0313A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	1,62	4,13	6,59	18,72	0,82	22,76	0	0,73	0,88	7,24	18,17	3,05	1,43	10,34	0	0	0,62
2001-34-0255A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	2,63	3,62	8,88	25,45	0,78	22,22	0,85	1,03	1,55	3,94	8,07	2,23	1,38	12,14	2,78	0	0
2001-34-0312A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	2,29	4,01	9,42	24,56	0,77	22,28	0,68	0	1,13	6,33	8,32	2,92	2,01	12,18	3,09	0	0
2001-34-0279A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	2,36	2,44	9,33	24,43	0,92	23,19	0,36	0,52	0,91	7,13	6,81	4,22	2,16	8,60	2,88	0,59	0,53
2001-34-0274A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	2,27	2,48	8,84	24,25	0,68	22,63	0,42	0,53	0,86	7,32	7,39	4,20	2,23	9,80	3,01	0,55	0,46
2001-34-0299A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	2,48	3,65	9,00	21,67	0,90	23,10	0	0	1,20	7,77	10,44	2,92	1,82	11,31	2,51	0	0,64
2001-34-0275A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	1,32	2,00	6,76	24,79	1,03	21,09	0,38	0,41	0,60	9,43	9,13	4,76	2,85	8,85	2,97	0,59	0,58
2001-34-0276A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	1,72	1,95	8,23	22,70	1,28	22,79	0	0	0,77	10,59	7,37	5,24	3,03	8,16	3,13	0,78	0,56
2001-34-0324A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	1,32	2,83	5,03	23,10	1,13	23,82	0,35	0,40	0,66	10,47	9,27	3,68	2,87	8,20	3,63	0,47	0,60
2001-34-0289A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	1,11	1,49	5,09	21,51	1,07	22,05	0,23	0,37	0,59	11,43	12,15	5,19	3,36	7,47	2,73	0,58	0,71
2001-34-0298A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	1,07	2,20	4,38	18,62	1,12	23,54	0	0,39	0,39	13,22	14,97	4,44	2,58	7,21	2,58	0,56	1,03
2001-34-0287A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	1,56	2,06	6,59	17,44	0,92	22,83	0	0,51	0,71	10,18	12,24	5,19	2,59	9,67	2,64	0,74	0,89
2001-35-0053A	<i>Micromonospora</i>	HAWAI	2	0,54	2,03	4,52	15,12	0,74	19,92	0	0,36	0,78	5,42	13,85	8,58	4,36	10,84	5,53	1,62	1,22

Cultivo	Taxonomía inicial	Origen	Cluster	14:0 ISO	15:0	15:0 ANTEISO	15:0 ISO	16:0	16:0 ISO	16:1 CIS 9	16:1 ISO F	16:1 ISO H	17:0	17:0 10METHYL	17:0 ANTEISO	17:0 ISO	17:1 CIS 9	17:1 ISO C	18:1 CIS 9	TBSA 18:0 10METHYL
2001-35-0127A	<i>Micromonospora</i>	HAWAI	2	0,60	1,93	3,67	26,77	0	16,90	0	1,37	1,37	3,49	14,89	3,57	2,65	17,01	5,01	0,77	0
2001-35-0208A	<i>Micromonospora</i>	HAWAI	2	0,86	2,17	4,55	28,51	0,32	16,70	0	0,78	0,98	3,26	15,26	2,77	2,80	16,89	3,57	0,58	0
2001-35-0100A	<i>Micromonospora</i>	HAWAI	2	0,52	2,00	3,02	26,33	0,41	19,04	0	0,92	1,00	5,22	14,98	3,31	3,00	14,19	4,13	0,62	0,44
2001-34-0064A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	1,08	2,71	1,47	9,47	0,78	37,64	0,36	0,64	1,16	2,43	9,78	1,88	1,89	17,34	3,71	3,91	0,64
2001-34-0119A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	1,09	4,00	2,10	11,39	1,00	38,03	0	1,13	1,53	2,04	11,41	1,88	1,37	16,37	3,44	2,09	0,57
2001-34-0118A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	1,13	2,66	1,56	13,61	0,72	36,70	0,46	0,55	1,50	2,23	6,06	1,90	2,31	17,61	5,26	3,90	0,54
2001-34-0121A	micelio estéril	REUNIÓN	2	0,99	3,35	1,74	10,11	0,50	40,05	0	1,20	1,26	1,80	15,74	1,76	1,14	12,52	3,06	2,14	0,79
2001-34-0366A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	0,87	4,66	1,91	10,69	0,41	36,13	0,18	1,40	1,11	1,71	15,49	1,51	0,98	14,29	2,62	2,40	0,69
2001-34-0310A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	1,65	1,56	4,51	15,58	0,62	34,55	0	0,41	1,48	3,75	13,14	3,52	1,51	9,25	2,82	0,80	0,69
2001-34-0335A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	1,88	1,52	4,62	16,66	0,68	33,17	0,54	0,47	1,67	3,63	12,18	3,51	1,93	9,10	3,36	0,58	0,74
2001-34-0111A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	1,95	1,27	3,83	15,18	0,49	37,46	0	0,46	2,14	2,43	12,72	3,20	1,44	9,49	2,93	0,74	0,76
2001-34-0260A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	2,28	2,08	6,07	19,14	0,64	31,76	0,36	0,48	1,45	3,86	10,30	3,29	1,65	9,70	2,91	0,46	0,38
2001-34-0341A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	1,45	8,63	2,99	13,26	0,62	26,84	0	1,12	1,14	3,11	9,42	1,23	1,16	19,42	2,13	2,08	0,58
2001-34-0261A	<i>Micromonospora</i>	REUNIÓN	2	1,10	6,56	3,31	16,15	0,41	32,23	0	1,06	1,53	1,99	11,63	1,57	1,08	14,99	2,97	1,57	0,48
MEDIA				1,52	3,08	5,57	20,02	0,76	25,94	0,21	0,64	1,07	5,44	12,33	3,29	1,97	11,54	2,52	0,87	0,55
MIN				0,52	1,27	1,47	9,47	0	16,70	0	0	0,39	1,71	6,06	1,23	0,98	7,21	0	0	0
MAX				2,63	8,63	9,42	28,51	1,28	40,05	0,85	1,40	2,14	13,22	18,17	8,58	4,36	19,42	5,53	3,91	1,22
% cultivos				100	100	100	100	97,44	100	51,28	92,31	100	100	100	100	100	100	79,49	84,62	84,62

Ácidos grasos mayoritarios del cultivo del *cluster* 3.

Cultivo	Taxonomía inicial	Origen	Cluster	14:0	14:0 ISO	15:0	15:0 ANTEISO	15:0 ISO	15:1 B	16:0	16:0 ISO	16:1 CIS 9	16:1 ISO H	17:0	17:0 ANTEISO	17:0 ISO	17:1 CIS 9	17:1 ISO C	18:0	18:1 CIS 9
2001-34-0050A	micelio estéril	REUNIÓN	3	1,47	4,58	1,84	9,93	19,93	0,88	3,70	13,49	5,72	1,39	4,97	3,09	1,25	11,07	0,70	2,33	12,03

Ácidos grasos mayoritarios de los cultivos agrupados en el *cluster* 4.

Cultivo	Taxonomía inicial	Origen	Cluster	14:0 ISO	15:0	15:0 ANTEISO	15:0 ISO	15:1 B	16:0	16:0 10METHL	16:0 ISO	16:1 CIS 9	16:1 ISO H	17:0	17:0 10METHYL	17:0 ANTEISO	17:0 CYCLO	17:0 ISO	17:0 ISO 10METHYL	17:1 CIS 9	18:0	SUMMED FEATURE 4
2001-35-0021A	<i>Pseudonocardiaceae</i>	HAWAI	4	3,41	4,38	2,25	9,20	4,60	1,00	1,47	34,67	2,28	4,33	2,62	3,50	2,51	14,19	1,16	1,69	0	1,30	4,54
2001-35-0046A	<i>Pseudonocardiaceae</i>	HAWAI	4	3,38	4,70	1,89	8,34	4,22	1,29	1,26	34,41	2,52	3,66	3,21	3,45	2,24	16,14	1,10	1,78	0	1,27	4,03
2001-35-0032A	<i>Pseudonocardiaceae</i>	HAWAI	4	2,54	3,71	1,32	9,39	3,60	1,24	2,06	38,49	2,53	4,05	2,96	4,65	2,36	13,20	1,35	2,33	0	0,81	2,69
2001-35-0026A	<i>Pseudonocardiaceae</i>	HAWAI	4	4,47	5,87	4,85	6,71	3,30	1,58	1,25	35,93	2,58	4,23	3,45	2,07	4,49	10,99	1,03	0,92	0	1,85	3,22
2001-35-0052A	<i>Pseudonocardiaceae</i>	HAWAI	4	0	8,02	3,61	10,23	4,71	1,33	1,44	34,31	2,03	3,56	4,59	3,52	3,08	10,42	0,82	2,07	0	1,17	3,58
2001-34-0079A	micelio estéril	REUNIÓN	4	5,32	3,15	2,26	9,01	3,41	0,87	1,25	43,07	0,83	5,63	0,82	1,36	2,02	12,10	0,63	3,10	0	0,89	2,32
2001-34-0085A	micelio estéril	REUNIÓN	4	4,82	4,64	2,31	6,44	10,06	0	1,12	30,75	1,16	4,56	1,12	2,92	1,77	18,78	0	3,92	0	1,26	3,85
2001-34-0046A	micelio estéril	REUNIÓN	4	6,91	4,90	1,88	6,98	4,28	1,68	0	36,02	0	0	6,05	0	1,58	9,74	0,68	8,65	4,85	0	4,24
2001-35-0020A	<i>Pseudonocardiaceae</i>	HAWAI	4	2,77	4,34	2,23	9,35	3,52	1,00	1,63	38,87	2,09	4,18	3,15	3,73	2,95	0	1,21	2,12	12,97	0	3,30
2001-35-0029A	<i>Pseudonocardiaceae</i>	HAWAI	4	3,02	4,70	1,67	9,51	3,83	1,17	1,57	37,51	2,56	3,42	3,25	3,87	2,41	0	1,10	1,95	14,69	0,92	2,84
2001-34-0082A	<i>Amycolatopsis</i>	REUNIÓN	4	4,48	4,49	3,54	9,90	1,63	0,66	0	37,52	1,80	8,35	1,88	1,09	2,90	4,73	0,78	0,28	9,83	0,62	1,59
2001-34-0068A	<i>Pseudonocardiaceae</i>	REUNIÓN	4	4,38	4,50	3,31	9,64	1,54	0,76	0	39,19	1,81	7,92	2,01	1,14	2,86	4,59	0,85	0,29	9,64	0,62	1,51
2001-35-0150A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	4	3,39	2,74	3,51	10,29	7,52	0	0	31,42	1,67	7,00	1,20	4,56	2,63	0	0	2,18	12,95	0	5,57
2001-35-0023A	<i>Pseudonocardiaceae</i>	HAWAI	4	2,12	3,67	1,22	7,92	3,26	0,93	1,63	31,61	2,00	3,03	3,13	4,53	2,08	13,40	1,07	1,95	12,82	0,94	2,68
2001-35-0049A	<i>Pseudonocardiaceae</i>	HAWAI	4	2,52	4,03	1,27	8,50	3,54	1,02	1,50	31,61	2,44	3,13	2,62	3,40	1,75	14,00	0,86	1,86	13,16	0	2,79
2001-35-0037A	<i>Pseudonocardiaceae</i>	HAWAI	4	2,42	3,60	1,33	8,27	3,26	1,03	1,49	34,13	2,24	3,66	2,40	3,31	1,93	12,23	1,00	1,80	11,89	0,76	2,56
2001-35-0039A	<i>Pseudonocardiaceae</i>	HAWAI	4	4,36	4,77	2,00	9,07	5,39	0,79	1,12	32,56	1,66	4,00	1,75	1,91	1,67	12,66	0,92	1,34	8,43	0,77	4,25
2001-34-0203A	micelio estéril	REUNIÓN	4	3,71	4,84	1,84	8,34	3,42	0,80	1,20	37,37	1,52	2,62	2,30	2,63	1,82	10,55	0,78	2,29	9,21	0,89	3,38
2001-35-0063A	<i>Pseudonocardiaceae</i>	HAWAI	4	1,93	3,28	1,13	6,36	2,56	1,18	1,73	36,81	2,11	3,71	3,21	4,97	2,11	10,48	1,06	2,15	12,15	0,74	1,89
2001-35-0025A	<i>Pseudonocardiaceae</i>	HAWAI	4	4,01	7,82	3,64	8,58	3,79	0,95	0,82	30,77	1,38	3,07	4,00	2,18	2,78	7,24	0,66	1,39	11,63	0,94	2,69
2001-35-0054A	<i>Pseudonocardiaceae</i>	HAWAI	4	3,78	5,60	3,00	8,47	3,05	1,03	1,00	32,63	2,13	3,19	2,88	2,23	2,86	9,44	0,75	1,05	12,82	0	2,70
2001-35-0011A	<i>Pseudonocardiaceae</i>	HAWAI	4	4,22	5,90	4,97	6,79	2,69	1,48	0,91	33,59	2,62	3,44	2,81	1,57	4,01	8,75	0,68	0,75	8,56	1,71	2,21
2001-34-0113A	micelio estéril	REUNIÓN	4	8,92	10,06	2,14	7,27	4,68	1,40	0,45	31,69	1,23	2,10	3,19	1,04	1,04	8,93	0	1,59	7,02	0,48	2,79
2001-34-0266A	micelio estéril	REUNIÓN	4	2,09	2,39	3,05	9,22	0,69	7,57	0	33,23	5,78	2,41	1,41	0	13,83	6,89	4,84	0	0	2,01	0,89
2001-35-0140A	<i>Saccharopolyspora</i>	HAWAI	4	2,41	0	3,70	10,78	0	0,43	0	33,22	0	16,64	0	2,59	6,56	5,70	1,21	0	0	1,27	0

Cultivo	Taxonomía inicial	Origen	Cluster	14:0 ISO	15:0	15:0 ANTEISO	15:0 ISO	15:1 B	16:0	16:0 10METHL	16:0 ISO	16:1 CIS 9	16:1 ISO H	17:0	17:0 10METHYL	17:0 ANTEISO	17:0 CYCLO	17:0 ISO	17:0 ISO 10METHYL	17:1 CIS 9	18:0	SUMMED FEATURE 4
2001-35-0024A	<i>Pseudonocardiaceae</i>	HAWAI	4	2,33	3,57	1,36	9,84	3,74	0,79	1,48	28,61	0	3,42	2,47	3,55	1,81	0	0,86	1,80	12,29	0	5,46
MEDIA				3,75	4,79	2,51	8,63	3,85	1,33	1,32	34,61	2,13	4,61	2,74	2,91	3,00	10,69	1,10	2,05	10,88	1,06	3,10
MIN				0	0	1,13	6,36	0	0	0	28,61	0	0	0	0	1,04	0	0	0	0	0	0
MAX				8,92	10,06	4,97	10,78	10,06	7,57	2,06	43,07	5,78	16,64	6,05	4,97	13,83	18,78	4,84	8,65	14,69	2,01	5,57
% cultivos				96,15	96,15	100	100	96,15	92,31	76,92	100	88,46	96,15	96,15	92,31	100	84,62	88,46	92,31	65,38	76,92	96,15

Ácidos grasos mayoritarios de los cultivos agrupados en el *cluster* 5.

Cultivo	Taxonomía inicial	Origen	Cluster	14:0	14:0 ISO	15:0	15:0 ANTEISO	15:0 ISO	16:0	16:0 10METHL	16:0 2OH	16:0 ISO	16:0 ISO 2OH	16:1 CIS 9	17:0	17:0 10METHYL	17:1 CIS 9	18:1 CIS 9	TBSA 18:0 10METHYL
2001-34-0282A	<i>Streptosporangium</i>	REUNIÓN	5	4,10	8,77	4,42	1,19	1,26	16,56	7,06	1,20	10,65	1,19	19,56	1,21	5,31	10,21	3,66	1,39
2001-34-0358A	<i>Actinomadura</i>	REUNIÓN	5	2,72	4,53	3,78	0,78	1,37	19,10	8,87	0	10,14	0,75	12,40	1,91	10,50	9,97	5,05	2,98
2001-35-0141A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	5	4,94	1,04	9,92	0	0	27,69	1,49	0	8,73	0	7,24	6,21	3,65	7,63	12,26	4,71
2001-35-0195A	<i>Actinomadura</i>	HAWAI	5	1,20	1,76	9,97	0	0	3,79	2,87	0	19,84	0	5,68	0,83	14,72	5,17	1,34	5,67
2001-35-0200A	<i>Actinomadura</i>	HAWAI	5	1,13	1,22	15,09	0	0,38	5,18	2,71	0	16,04	0	6,62	1,15	18,14	12,66	3,32	0
2001-35-0197A	<i>Actinomadura</i>	HAWAI	5	1,12	1,54	11,65	0	0	3,05	2,59	10,77	20,01	13,75	5,48	0	15,36	4,10	0,81	0
2001-35-0199A	<i>Actinomadura</i>	HAWAI	5	0,94	1,14	14,15	0	0	3,82	2,61	8,18	17,11	8,72	6,17	0,77	15,18	10,17	2,10	0
MEDIA				2,31	2,86	9,86	0,28	0,43	11,31	4,03	2,88	14,65	3,49	9,02	1,73	11,84	8,56	4,07	2,11
MIN				0,94	1,04	3,78	0	0	3,05	1,49	0	8,73	0	5,48	0	3,65	4,10	0,81	0
MAX				4,94	8,77	15,09	1,19	1,37	27,69	8,87	10,77	20,01	13,75	19,56	6,21	18,14	12,66	12,26	5,67
% cultivos				100	100	100	28,57	42,86	100	100	42,86	100	57,14	100	85,71	100	100	100	57,14

Ácidos grasos mayoritarios de los cultivos agrupados en el *cluster* 6.

Cultivo	Taxonomía inicial	Origen	Cluster	14:0 ISO	15:0	15:0 ANTEISO	15:0 ISO	16:0	16:0 ISO	16:1 CIS 9	16:1 ISO H	17:0 ANTEISO	17:0 CYCLO	17:0 ISO	17:0 ISO 2OH	17:1 ANTEISO C	17:1 ISO C	18:1 2OH	SUMMED FEATURE 4	SUMMED FEATURE 7	TBSA 18:0 10METHYL
2001-35-0169A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	13,03	1,32	24,69	3,89	1,77	21,62	3,24	12,10	4,71	2,54	1,01	0	3,55	2,39	0	0	0	0
2001-35-0244A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	12,78	1,08	21,91	3,38	1,79	22,92	3,63	11,89	5,31	2,72	0,95	0,36	3,87	2,84	0	0	0	0
2001-35-0142A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	16,77	1,05	20,65	5,91	1,86	26,89	3,09	9,86	3,65	0,82	1,14	0	3,25	2,09	0	0	0	0
2001-34-0012A	<i>Streptomyces</i>	ALASKA	6-a	9,20	2,46	21,32	9,15	2,03	25,52	2,47	14,48	4,59	0	1,22	0	3,17	1,71	0,59	0	0	0
2001-35-0060A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	8,90	0,84	25,85	4,99	2,08	25,72	2,64	14,35	4,92	0,82	1,10	0	3,93	1,93	0	0	0	0
2001-34-0054A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-a	13,41	1,51	18,08	11,83	1,62	24,67	2,50	13,77	2,71	0,50	1,78	0	2,78	2,52	0	0	0	0
2001-35-0171A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	11,74	1,94	19,60	8,76	2,03	22,27	5,69	12,63	2,49	1,16	1,42	0	2,19	3,37	0	0	0	0
2001-34-0022A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-a	15,57	0,96	16,14	7,65	1,11	26,97	1,15	16,07	3,20	0,58	1,36	0	3,19	2,86	0	0	0	0
2001-35-0144A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	9,62	1,06	18,99	8,71	1,49	17,96	6,44	16,57	3,48	0,77	1,35	0	5,40	4,81	0	0	0	0
2001-35-0018A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	16,65	3,64	26,04	6,90	3,17	24,71	2,14	5,04	3,81	1,06	0,98	0	1,91	1,09	0	0	0	0
2001-35-0069A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	11,08	2,03	26,83	7,29	3,35	25,37	3,16	7,03	4,80	1,38	1,20	0	2,71	1,38	0	0	0	0
2001-35-0118A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	15,52	1,02	27,68	3,31	1,85	29,41	3,13	6,96	5,10	1,03	0,87	0	2,43	1,03	0	0	0	0
2001-35-0038A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	8,89	1,28	24,32	4,56	3,76	19,48	3,36	10,24	4,51	0,77	1,07	0	2,84	1,43	0	0	5,47	0
2001-34-0010A	<i>Streptomyces</i>	ALASKA	6-a	13,25	1,77	18,73	13,05	2,39	22,19	1,96	5,40	6,57	0,63	3,10	0	3,59	3,82	0	0	0	0
2001-35-0104A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	10,50	0	19,96	13,06	1,14	22,49	1,79	7,06	7,04	1,11	3,44	0	4,07	6,33	0	0	0	0
2001-35-0149A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	11,80	0,89	23,64	13,36	2,02	21,60	1,95	6,79	4,57	1,71	1,95	0	3,72	3,70	0	0	0	0
2001-34-0011A	<i>Streptomyces</i>	ALASKA	6-a	7,40	1,69	21,98	13,33	2,72	18,44	2,23	4,82	8,90	1,07	3,82	0	5,56	4,72	0	0	0	0
2001-35-0040A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	5,96	1,33	15,75	16,38	2,90	22,72	5,38	7,52	4,47	1,07	2,67	0	4,05	6,94	0	0	0	0
2001-35-0057A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	9,04	1,65	21,63	7,30	5,02	25,85	2,90	4,48	8,03	0,93	2,30	0	4,48	2,86	0	0	0	0
2001-35-0138A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	7,92	1,60	24,45	7,16	4,80	23,25	3,15	6,20	7,96	1,52	2,84	0	3,52	2,55	0	0	0	0
2001-35-0217A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	6,64	2,17	21,51	7,79	6,28	22,76	5,85	4,82	6,46	1,38	1,76	0	5,10	3,26	0	0	0	0
2001-35-0216A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	6,41	1,67	23,92	6,80	6,19	26,89	2,33	2,99	8,29	2,80	2,30	0	3,15	2,03	0	0	0	0
2001-34-0070A	micelio estéril	REUNIÓN	6-a	5,04	1,31	23,83	10,15	4,98	22,18	4,68	3,83	5,24	4,76	1,84	0	5,79	2,86	0	0	0	0
2001-35-0084A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	13,29	1,84	27,99	10,48	0,83	21,17	1,52	5,28	5,90	0,39	1,12	0	4,70	3,60	0	0	0	0
2001-35-0137A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	11,47	1,68	25,67	8,11	3,78	18,68	3,77	7,65	5,08	1,64	1,91	0	3,54	2,57	0	0	0	0

Cultivo	Taxonomía inicial	Origen	Cluster	14:0 ISO	15:0	15:0 ANTEISO	15:0 ISO	16:0	16:0 ISO	16:1 CIS 9	16:1 ISO H	17:0 ANTEISO	17:0 CYCLO	17:0 ISO	17:0 ISO 2OH	17:1 ANTEISO C	17:1 ISO C	18:1 2OH	SUMMED FEATURE 4	SUMMED FEATURE 7	TBSA 18:0 10METHYL
2001-35-0136A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	8,36	1,27	26,88	10,46	1,04	20,33	1,26	10,87	7,37	0	1,92	0	6,28	3,37	0	0	0	0
2001-35-0131A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	10,02	0,50	25,70	7,71	1,34	18,84	2,92	11,13	5,17	0,61	1,80	0	4,86	5,90	0	0	0	0
2001-34-0009A	<i>Streptomyces</i>	ALASKA	6-a	6,41	0,98	27,88	11,33	0,57	25,84	0,23	7,66	8,38	0	1,55	0	5,02	2,37	0	0	0	0
2001-34-0008A	<i>Streptomyces</i>	ALASKA	6-a	7,13	1,03	29,68	11,52	0,59	23,32	0	8,73	7,24	0	1,27	0	5,24	2,33	0	0	0	0
2001-34-0150A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-a	8,03	1,32	27,93	12,88	2,41	25,32	1,82	6,43	5,72	0,94	2,24	0	2,43	1,56	0	0	0	0
2001-35-0090A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	6,42	1,40	32,16	6,53	3,48	20,82	1,46	5,02	6,65	3,50	2,17	0,34	4,53	2,77	0	0	0	0
2001-35-0186A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	4,97	1,53	31,09	8,32	2,39	18,79	2,72	5,08	6,61	1,43	3,13	0,25	4,92	5,01	0	0	0	0
2001-35-0016A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	7,52	2,32	30,80	8,38	4,01	23,49	1,44	3,13	7,99	1,70	1,94	0	2,81	1,68	0	0	0	0
2001-35-0015A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	8,32	1,52	33,26	7,90	1,98	21,51	1,41	7,95	6,81	0,40	0,91	0	5,04	1,40	0	0	0	0
2001-35-0193A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	5,41	0,75	32,93	7,32	1,49	16,33	2,50	9,60	9,42	0,89	1,34	0	7,37	2,25	0	0	0	0
2001-35-0086A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	7,28	0,81	21,54	10,81	2,52	31,22	1,66	4,73	7,26	0,65	3,23	0	3,44	4,28	0	0	0	0
2001-35-0006A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	8,84	2,09	21,04	10,67	3,38	31,50	2,21	6,22	4,54	1,50	1,86	0	2,75	2,42	0	0	0	0
2001-35-0014A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	6,59	1,06	17,17	15,00	2,21	28,54	3,58	4,68	5,47	0,58	2,92	0	3,27	5,80	0	0	0	0
2001-35-0042A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	8,11	1,20	16,34	14,25	2,10	30,65	3,12	5,44	4,76	0,69	2,53	0	2,98	5,08	0	0	0	0
2001-35-0001A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	12,03	1,48	18,04	8,12	2,19	33,76	1,02	8,31	4,91	0,99	1,87	0	3,62	1,91	0	0	0	0
2001-35-0019A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	3,11	1,84	15,96	10,84	6,19	29,85	2,57	2,75	9,22	2,65	4,58	0	3,78	3,55	0	0	0	0
2001-35-0135A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	24,14	1,06	21,44	9,87	1,70	20,05	1,49	7,54	2,04	1,26	1,55	0	2,73	2,35	0	0	0	0
2001-35-0148A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	20,73	1,03	20,69	9,35	1,89	22,28	1,71	7,90	2,15	1,29	1,54	0	2,83	2,55	0	0	0	0
2001-35-0143A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	19,15	1,00	24,52	9,25	2,09	17,87	2,10	11,68	2,72	1,42	1,58	0	3,22	2,53	0	0	0	0
2001-35-0191A	<i>Streptomyces</i>	ALASKA	6-a	23,26	5,62	24,10	8,92	3,28	18,31	2,05	2,41	3,39	0	1,56	0	1,64	1,38	0	0	0	0
2001-34-0158A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-a	12,58	2,62	11,93	11,83	1,24	23,81	0	10,39	2,41	3,38	1,87	0	1,96	1,77	0	6,22	0	0
2001-35-0110A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	8,88	2,55	14,69	13,57	2,13	21,75	0	4,82	4,24	3,53	2,62	0	3,45	1,72	0	8,43	0	0
2001-34-0153A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-a	7,15	2,77	10,08	11,80	10,67	24,43	2,36	7,27	2,99	3,66	3,43	0	2,27	1,76	0	3,33	0	0
2001-34-0152A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-a	8,50	3,24	11,07	11,86	9,08	24,74	2,28	5,92	2,68	3,58	2,68	0	1,21	1,56	0	4,50	0	0
2001-35-0092A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	3,95	3,08	27,53	24,05	5,41	12,40	1,11	1,98	6,02	1,83	3,45	0	3,41	3,85	0	0	0	0
2001-35-0112A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	4,51	0,96	31,88	21,13	2,63	16,10	1,37	3,21	7,37	1,93	0	0	1,62	1,75	0	0	0	0
2001-35-0139A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	5,65	1,01	25,00	17,68	1,25	16,65	0,61	4,03	8,78	1,28	5,05	0	4,39	5,96	0	0	0	0

Cultivo	Taxonomía inicial	Origen	Cluster	14:0 ISO	15:0	15:0 ANTEISO	15:0 ISO	16:0	16:0 ISO	16:1 CIS 9	16:1 ISO H	17:0 ANTEISO	17:0 CYCLO	17:0 ISO	17:0 ISO 2OH	17:1 ANTEISO C	17:1 ISO C	18:1 2OH	SUMMED FEATURE 4	SUMMED FEATURE 7	TBSA 18:0 10METHYL
2001-35-0145A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	7,18	1,29	22,14	22,23	1,09	15,92	0,72	4,62	6,94	1,01	4,89	0	4,04	5,92	0	0	0	0
2001-34-0223A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-a	2,10	4,33	23,85	19,60	3,02	16,65	1,28	1,88	7,00	1,08	5,51	0,39	3,03	5,99	0	0	0	0
2001-34-0190A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-a	3,90	1,05	20,94	19,93	3,09	16,00	3,32	5,29	5,59	0,86	3,64	0	5,31	7,67	0	0	0	0
2001-34-0195A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-a	3,12	1,11	19,33	22,31	3,28	14,14	3,87	5,44	5,31	0,70	3,85	0	4,97	9,15	0	0	0	0
2001-34-0086A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-a	3,08	2,87	18,22	21,47	5,54	20,78	1,40	4,33	5,12	3,52	4,36	0	2,41	4,44	0	0	0	0
2001-34-0301A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-a	4,88	1,85	16,25	24,84	4,07	20,01	2,84	4,87	4,31	0,30	4,21	0	2,74	5,40	0	0	0	0
2001-35-0101A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	7,27	0,77	14,47	28,04	3,72	16,07	3,09	5,72	2,77	1,36	4,39	0	1,61	6,28	0	1,24	0	0
2001-35-0102A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-a	7,85	1,00	12,63	23,91	2,08	23,51	2,73	7,79	2,85	1,28	3,23	0	2,49	5,95	0	0,87	0	0
2001-35-0159A	micelio estéril	HAWAI	6-a	3,47	1,15	17,48	21,64	0,38	21,50	0,55	3,52	5,63	0,97	5,56	0	2,39	1,57	0	0	0	0
2001-34-0176A	micelio estéril	REUNIÓN	6-a	2,12	2,25	13,94	26,20	3,74	17,15	2,17	0	4,12	8,31	3,41	0	0	1,72	0	2,45	0	0
2001-34-0302A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-b	1,85	0,95	35,16	27,05	3,65	4,20	2,09	3,72	6,71	1,21	4,24	0	3,46	3,88	0	0	0	0
2001-34-0125A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-b	1,32	1,00	34,70	27,53	3,71	4,66	1,94	3,21	7,39	1,18	4,41	0	3,82	4,30	0	0	0	0
2001-34-0226A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-b	1,25	0,92	36,40	28,02	3,36	3,58	1,96	3,29	6,63	1,22	3,91	0	3,61	4,06	0	0	0	0
2001-34-0194A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-b	1,43	0,77	34,62	28,00	4,06	3,73	1,41	2,20	8,57	1,20	5,30	0	2,90	3,74	0	0	0	0
2001-34-0090A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-b	1,43	0,88	33,02	29,73	3,76	2,97	2,28	2,32	6,55	1,14	4,49	0	3,60	5,15	0	0	0	0
2001-34-0057A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-b	1,38	2,20	34,56	24,95	4,84	5,48	0,67	0,81	7,62	2,07	3,78	0	2,46	3,85	0	0	4,19	0
2001-35-0201A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-b	0,57	1,01	24,65	23,12	7,24	6,98	1,25	0,26	6,92	4,23	5,46	0	2,00	2,88	0	0,49	9,40	0
2001-34-0025A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	2,68	2,21	33,04	14,40	2,35	15,65	1,59	4,35	8,27	1,21	2,34	0	5,06	3,09	0	0	0	0
2001-34-0061A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	2,09	1,90	31,16	15,19	2,57	15,55	1,64	3,87	9,14	1,26	2,96	0	5,23	3,69	0	0	0	0
2001-34-0218A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	2,03	2,05	31,75	13,25	2,50	16,39	1,36	3,83	9,84	1,32	2,62	0,64	5,31	3,06	0	0	0	0
2001-34-0222A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	2,33	1,88	34,95	14,26	2,14	14,33	2,20	4,87	7,73	1,16	1,92	0	6,00	3,50	0	0	0	0
2001-34-0092A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	3,51	3,49	34,21	11,07	4,20	15,62	2,98	3,13	6,37	0,75	2,76	0	4,36	3,86	0	0	0	0
2001-34-0202A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	4,52	1,45	35,52	11,37	1,22	14,39	2,57	6,72	7,13	0	1,37	0	7,20	3,90	0	0	0	0
2001-34-0210A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	5,24	1,06	33,21	13,27	1,17	14,14	2,74	7,54	5,96	0	1,69	0	6,34	4,62	0	0	0	0
2001-34-0192A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	6,71	1,11	34,74	12,80	1,54	12,60	2,94	5,82	6,64	0,82	1,76	0	6,70	3,66	0	0	0	0
2001-35-0099A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-c	7,48	0,67	34,60	15,31	1,70	16,54	0,85	3,71	6,28	1,26	2,97	0	3,34	3,64	0	0,74	0	0
2001-34-0001A	micelio estéril	ALASKA	6-c	4,40	2,50	32,98	17,36	4,90	12,00	0,52	1,01	8,62	2,12	2,90	0	3,83	2,68	0	0	0,67	0,44

Cultivo	Taxonomía inicial	Origen	Cluster	14:0 ISO	15:0	15:0 ANTEISO	15:0 ISO	16:0	16:0 ISO	16:1 CIS 9	16:1 ISO H	17:0 ANTEISO	17:0 CYCLO	17:0 ISO	17:0 ISO 2OH	17:1 ANTEISO C	17:1 ISO C	18:1 2OH	SUMMED FEATURE 4	SUMMED FEATURE 7	TBSA 18:0 10METHYL
2001-35-0096A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-c	2,43	1,30	27,29	15,05	4,08	15,27	2,30	1,97	6,01	4,72	2,66	0	6,14	6,14	0	1,51	0	0
2001-35-0089A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-c	3,67	1,11	29,63	11,60	6,15	15,84	4,00	2,39	7,63	3,73	3,46	0	4,23	4,14	0	0	0	0
2001-34-0201A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	1,99	0,96	29,94	13,09	4,29	14,02	3,07	2,66	11,52	1,72	4,26	0	5,75	4,97	0	0	0	0
2001-34-0216A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	2,13	1,13	29,20	12,93	4,56	13,83	3,35	2,89	11,35	1,46	4,36	0	5,47	4,83	0	0	0	0
2001-34-0179A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	2,50	0,94	29,72	13,19	4,01	14,42	2,94	3,10	10,62	1,42	3,90	0	5,89	5,00	0	0	0	0
2001-34-0071A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	2,05	0,91	31,98	12,64	4,80	13,44	3,84	2,95	10,68	1,25	3,56	0	5,74	4,75	0	0	0	0
2001-34-0291A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	1,46	1,46	28,64	12,46	3,95	13,35	4,05	3,13	10,73	1,39	3,80	0	7,32	6,27	0	0	0	0
2001-34-0134A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	1,86	1,37	29,22	12,15	5,25	12,68	4,81	2,56	11,11	1,85	3,64	0	6,19	4,78	0	0	0	0
2001-34-0141A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	2,03	1,47	30,13	13,03	5,38	11,38	5,34	2,65	10,03	1,93	3,52	0	6,02	4,96	0	0	0	0
2001-34-0100A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	2,13	1,15	30,36	14,50	4,27	12,36	4,18	3,46	8,37	1,27	3,27	0	6,47	6,12	0	0	0	0
2001-34-0101A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	2,34	1,08	30,15	14,33	4,20	12,87	4,14	3,17	8,87	1,11	3,70	0	6,29	5,83	0	0	0	0
2001-34-0103A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	2,18	1,05	28,90	14,62	4,03	13,06	3,98	3,30	9,04	1,18	3,84	0	6,41	6,32	0	0	0	0
2001-34-0098A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	1,51	1,08	28,46	14,68	4,59	11,01	3,47	2,35	11,12	1,45	4,95	0	6,44	6,58	0	0	0	0
2001-34-0186A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	1,29	0,88	28,00	14,04	4,48	10,62	4,04	2,90	10,97	1,34	4,42	0	7,16	6,80	0	0	0	0
2001-34-0362A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	1,33	0,96	28,79	13,94	3,76	10,43	3,80	2,78	11,03	1,00	4,27	0	7,88	7,13	0	0	0	0
2001-34-0198A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	3,41	1,14	27,68	12,35	3,69	11,87	2,79	4,73	9,79	1,18	4,23	0	6,78	7,36	0	0	0	0
2001-34-0067A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	2,04	0,83	31,88	13,51	5,71	10,55	2,78	1,73	11,60	0,96	5,26	0	4,78	5,00	0	0	0	0
2001-34-0146A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	1,86	1,05	31,21	14,91	3,49	11,11	3,22	2,85	9,72	0,93	3,88	0	6,94	6,42	0	0	0	0
2001-34-0199A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	1,55	1,09	33,06	13,89	3,25	10,57	3,41	2,87	10,25	0,85	3,48	0	7,81	6,04	0	0	0	0
2001-34-0256A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	1,71	0,93	31,35	11,82	3,14	11,81	2,89	3,19	12,08	0,93	3,77	0	8,19	5,66	0	0	0	0
2001-34-0074A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	1,78	1,12	34,12	12,34	4,21	10,47	3,57	2,67	11,10	1,16	3,33	0	7,61	5,12	0	0	0	0
2001-34-0243A	<i>Streptomyces</i>	ALASKA	6-c	1,70	1,38	34,31	11,33	3,83	11,90	2,90	2,88	11,68	1,10	3,08	0	7,56	4,71	0	0	0	0
2001-34-0167A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	1,83	1,22	34,07	12,12	4,68	11,35	5,20	3,24	9,85	0	2,92	0	7,78	5,07	0	0	0	0
2001-34-0151A	micelio estéril	REUNIÓN	6-c	3,00	1,28	31,81	14,33	5,58	11,15	4,92	3,33	8,02	0,91	3,36	0	4,99	4,21	0	0	0	0
2001-34-0320A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	1,82	1,83	29,59	12,43	4,59	14,00	7,34	3,65	9,57	0	2,46	0	6,41	4,19	0	0	0	0
2001-34-0193A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	0,96	1,02	30,86	11,36	4,52	9,15	3,83	2,15	14,34	1,05	4,00	0	8,52	5,65	0	0	0	0
2001-34-0221A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	1,95	2,88	28,33	13,31	4,85	9,52	6,69	3,85	5,49	3,04	1,81	0	4,84	3,22	0	0	1,60	0

Cultivo	Taxonomía inicial	Origen	Cluster	14:0 ISO	15:0	15:0 ANTEISO	15:0 ISO	16:0	16:0 ISO	16:1 CIS 9	16:1 ISO H	17:0 ANTEISO	17:0 CYCLO	17:0 ISO	17:0 ISO 2OH	17:1 ANTEISO C	17:1 ISO C	18:1 2OH	SUMMED FEATURE 4	SUMMED FEATURE 7	TBSA 18:0 10METHYL
2001-34-0105A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	2,92	1,21	36,45	7,09	4,90	13,73	6,48	3,81	7,57	1,21	1,52	0	6,92	3,20	0	0	0	0
2001-35-0009A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-c	8,03	5,45	28,63	13,81	3,53	15,28	2,74	1,81	6,07	2,89	2,24	0	3,06	2,42	0	0	0	0
2001-34-0183A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	3,77	0,89	29,14	10,19	2,69	14,01	2,61	3,73	12,72	0,88	3,66	0	7,30	4,89	0	0	0	0
2001-34-0211A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	3,37	0,80	27,42	9,51	4,22	14,07	2,23	4,29	12,27	1,45	4,13	0	7,38	6,10	0	0	0	0
2001-34-0215A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	3,31	0,86	24,47	7,58	3,42	17,30	1,71	5,42	14,44	0,98	4,36	0	7,61	5,21	0	0	0	0
2001-34-0212A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	3,22	0,88	25,31	7,44	3,15	17,48	1,72	5,77	14,19	1,00	3,85	0	8,13	5,05	0	0	0	0
2001-34-0214A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	3,96	1,05	25,23	7,38	3,50	17,87	1,66	6,52	12,70	1,12	4,01	0	7,77	5,14	0	0	0	0
2001-35-0002A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-c	3,16	1,25	26,44	8,98	3,23	24,34	1,33	3,34	13,40	0,97	3,92	0	4,64	2,87	0	0	0	0
2001-35-0097A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-c	2,67	1,35	38,58	10,95	4,60	10,62	4,22	1,95	6,92	3,24	1,97	0	4,10	3,25	0	0,75	0	0
2001-35-0109A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-c	2,26	1,54	39,76	10,87	5,26	9,96	3,03	1,40	7,71	3,72	2,22	0	3,79	3,15	0	0,55	0	0
2001-35-0095A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-c	1,82	1,68	39,04	13,37	3,74	9,00	4,69	1,63	7,67	4,86	1,86	0	4,97	3,96	0	0	0	0
2001-34-0087A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	2,24	1,98	38,10	16,04	3,11	11,20	3,83	1,91	6,69	2,33	1,83	0	4,71	3,39	0	0	0	0
2001-34-0013A	<i>Streptomyces</i>	ALASKA	6-c	1,98	3,06	40,76	12,40	7,20	10,73	1,79	1,42	8,28	3,06	2,22	0	2,81	2,06	0	0	0	0
2001-35-0067A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-c	2,20	3,96	38,89	10,51	8,93	11,31	1,33	1,05	9,38	3,67	2,72	0	1,89	1,56	0	0	0	0
2001-35-0117A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-c	3,03	0,56	43,24	13,24	2,34	8,36	1,52	1,28	11,13	1,94	2,73	0	3,36	3,08	0	0	0	0
2001-34-0213A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	4,31	1,89	39,14	13,21	1,98	9,57	2,96	5,95	6,19	0	1,58	0	5,72	3,13	0	0	0	0
2001-34-0123A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	1,76	2,00	35,30	16,51	3,20	8,78	4,00	1,82	9,31	0,50	3,46	0	4,50	4,44	0	0	0	0
2001-34-0225A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	1,63	1,99	34,40	15,94	3,57	9,05	3,69	1,99	11,00	0,86	3,91	0	4,81	4,55	0	0	0	0
2001-34-0104A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	1,76	1,51	38,23	16,89	3,66	8,33	4,51	2,16	9,44	0,54	3,35	0	4,92	4,71	0	0	0	0
2001-34-0052A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	1,93	1,45	37,14	16,96	3,43	8,53	4,46	2,07	9,11	0,65	3,26	0	4,93	4,68	0	0	0	0
2001-34-0065A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	1,73	1,70	35,88	16,98	3,91	9,14	4,49	1,98	9,31	0,64	3,62	0	4,35	4,44	0	0	0	0
2001-34-0031A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	1,39	1,43	32,83	18,18	3,70	9,94	2,58	1,52	12,02	0,40	5,08	0	4,27	4,37	0	0	0	0
2001-34-0122A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	1,10	1,07	39,30	16,54	3,69	6,28	4,40	1,42	11,52	0,63	3,91	0	5,13	4,53	0	0	0	0
2001-34-0157A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	1,53	1,57	41,03	13,94	4,17	6,61	4,40	1,23	11,52	0,90	3,56	0	4,06	3,50	0	0	0	0
2001-34-0044A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	2,60	2,00	38,95	17,78	3,42	7,96	4,44	2,30	6,70	0	2,50	0	4,41	4,27	0	0	0	0
2001-34-0184A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	2,44	1,57	39,23	20,39	2,66	8,49	2,88	2,07	7,73	0,31	2,90	0	4,00	3,70	0	0	0	0
2001-34-0096A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	2,70	1,76	42,94	20,44	2,48	7,48	2,80	2,05	6,07	0	2,19	0	3,73	3,28	0	0	0	0

Cultivo	Taxonomía inicial	Origen	Cluster	14:0 ISO	15:0	15:0 ANTEISO	15:0 ISO	16:0	16:0 ISO	16:1 CIS 9	16:1 ISO H	17:0 ANTEISO	17:0 CYCLO	17:0 ISO	17:0 ISO 2OH	17:1 ANTEISO C	17:1 ISO C	18:1 2OH	SUMMED FEATURE 4	SUMMED FEATURE 7	TBSA 18:0 10METHYL
2001-35-0192A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-c	1,98	1,59	37,31	11,61	4,71	10,67	0,87	0,46	12,04	1,37	7,03	0,32	1,86	3,47	0	0	0	0
2001-34-0172A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	1,00	0,72	37,58	9,80	3,70	12,54	2,84	1,50	16,83	0,82	2,87	0	4,48	3,91	0	0	0	0
2001-35-0157A	non- <i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-c	2,04	2,59	43,72	4,15	2,48	14,55	1,84	1,25	15,48	1,49	1,83	0	3,92	2,15	0	0	0	0
2001-35-0180A	non- <i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-c	3,16	2,84	39,99	4,41	3,60	14,12	2,83	1,35	14,23	1,77	1,79	0	3,85	2,41	0	0	0	0
2001-35-0161A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-c	2,63	2,01	40,03	3,68	3,67	12,01	2,48	1,34	18,86	1,43	2,18	0	4,28	2,33	0	0	0	0
2001-34-0217A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	1,39	1,01	36,35	8,85	2,95	9,78	3,00	3,54	12,48	0,80	2,45	0	10,32	4,61	0	0	0	0
2001-35-0129A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-c	1,02	0,91	37,06	8,51	2,69	7,66	2,77	2,52	16,56	0,51	3,14	0	10,56	4,61	0	0	0	0
2001-34-0023A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	0,75	1,69	42,78	7,43	3,56	5,72	4,13	1,24	14,67	0,96	2,08	0	10,27	3,33	0	0	0	0
2001-35-0130A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-c	0,81	0,67	36,81	6,37	1,49	6,40	0,91	2,93	15,87	1,01	1,89	0	10,32	3,21	0	0	0	0
2001-34-0178A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-c	8,21	3,84	36,82	6,73	2,40	19,02	2,37	3,70	5,26	1,10	1,40	0	3,16	1,94	0	0	0	0
2001-35-0051A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-c	7,42	3,24	38,56	8,81	6,97	15,24	1,55	1,60	5,64	2,71	1,34	0	1,58	0,88	0,45	0	0	0
2001-35-0183A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-c	3,41	5,26	34,09	2,04	5,72	18,69	3,69	1,40	9,58	3,83	0,57	0,57	3,89	0,78	0	0	0	0
2001-35-0185A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-d	2,37	2,55	47,02	8,95	3,36	11,04	0	0	8,12	1,92	4,21	0	2,78	3,03	0	0,52	0	0
2001-35-0245A	non- <i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-d	7,21	5,95	44,94	5,36	1,72	8,91	2,20	2,78	6,02	2,00	0,66	0	4,29	1,92	0	0	0	0
2001-34-0171A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-d	0	0,85	50,64	12,82	3,66	2,50	1,78	0,87	13,66	1,03	2,44	0	5,65	2,60	0	0	0	0
2001-34-0174A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-d	0,27	0,56	49,42	12,28	3,23	2,71	1,58	0,79	14,55	1,37	2,44	0	5,83	2,82	0	0	0	0
2001-34-0137A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-d	0,42	0,66	52,20	12,22	3,89	2,91	2,36	1,14	12,77	0,94	2,08	0	5,03	1,74	0	0	0	0
2001-35-0108A	<i>Streptomyces</i>	HAWAI	6-d	1,03	0,77	52,43	8,51	2,00	6,31	0,30	1,86	16,68	1,27	2,38	0	2,63	0,80	0	0	0	0
2001-34-0126A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-e	1,40	0,69	15,17	6,76	9,79	7,55	9,96	1,78	5,01	7,77	1,86	0	3,56	3,10	0	0	13,71	0
2001-34-0149A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-e	1,28	0,85	22,17	9,18	6,93	9,72	5,07	2,05	10,99	3,75	3,62	0	5,98	4,65	0	0	5,78	0,35
2001-35-0173A	micelio estéril	HAWAI	6-f	2,14	2,12	10,24	14,35	9,05	13,20	4,68	1,14	4,62	9,86	5,12	6,41	1,12	1,15	0	0	2,67	0
2001-35-0190A	<i>Streptomyces</i>	ALASKA	6-f	18,31	2,51	11,31	4,52	3,33	14,65	7,95	2,15	1,67	0	0,72	0,26	0,71	1,12	0,71	0	3,35	1,92
2001-34-0294A	<i>Streptomyces</i>	REUNIÓN	6-f	36,37	0,87	15,47	5,14	0,33	26,37	0	9,96	0,95	0	0	0	2,39	0	0	0	0	0
MEDIA				5,52	1,62	29,15	12,71	3,52	15,68	2,89	4,52	7,99	1,69	2,85	1,06	4,59	3,74	0,58	2,43	5,20	0,90
MIN				0	0	10,08	2,04	0,33	2,50	0	0	0,95	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MAX				36,37	5,95	52,43	29,73	10,67	33,76	9,96	16,57	18,86	9,86	7,03	6,41	10,56	9,15	0,71	8,43	13,71	1,92
% cultivos				99,36	99,36	100	100	100	100	96,79	98,72	100	91,03	98,72	5,77	99,36	99,36	1,92	8,33	5,77	1,92

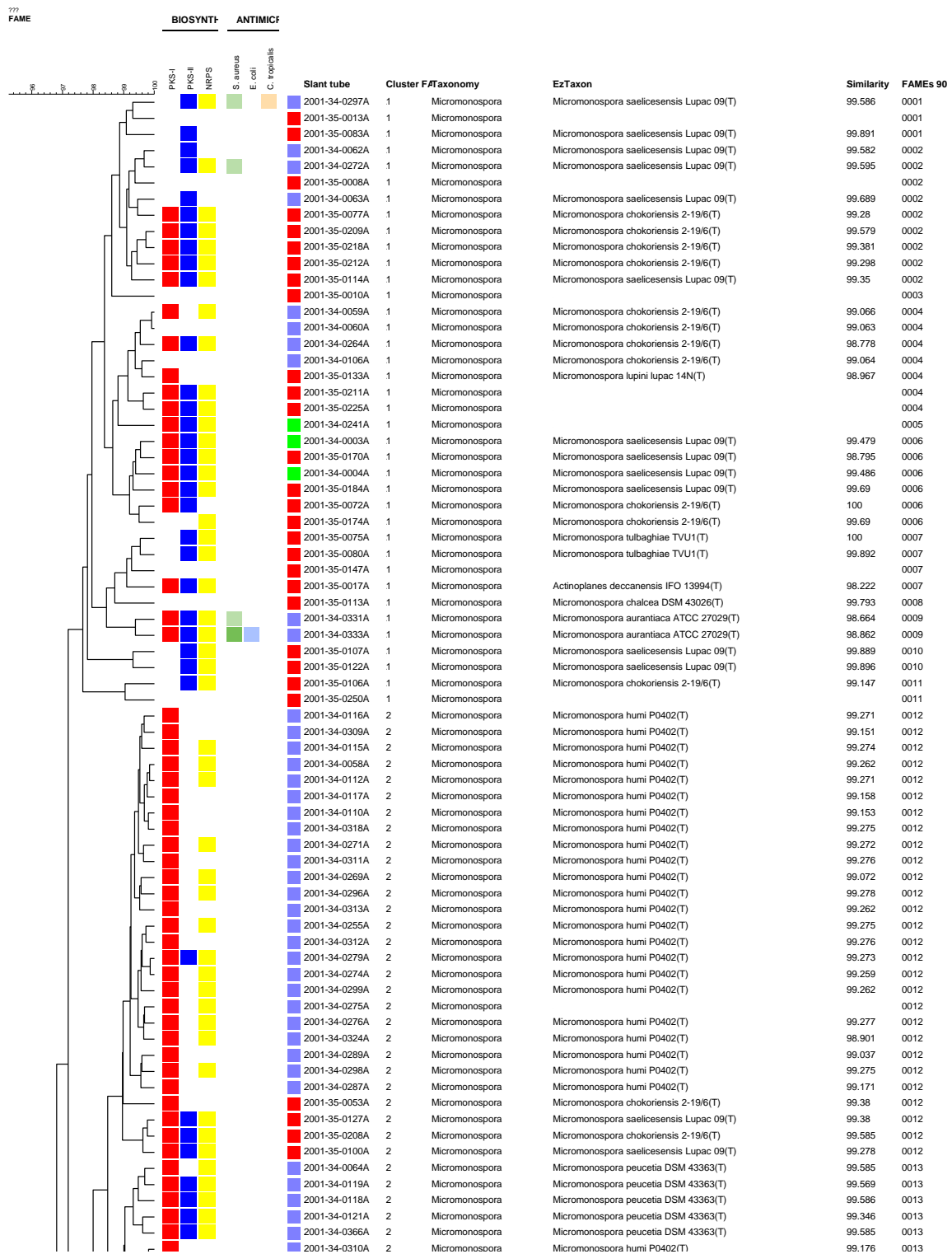
Ácidos grasos mayoritarios de los cultivos agrupados en el *cluster* 7.

Cultivo	Taxonomía inicial	Origen	Cluster	14:0 ISO	15:0 ANTEISO	15:0 ISO	15:1 B	16:0 ISO	16:1 CIS 9	16:1 ISO H	17:0 10METHYL	17:0 ANTEISO	17:0 ISO	17:1 ISO C	SUMMED FEATURE 2
2001-34-0015A	<i>Pseudonocardiaceae</i>	ALASKA	7	4,42	0,83	7,56	0,90	31,21	2,06	39,11	0,50	2,12	1,52	5,53	2,38
2001-34-0014A	<i>Pseudonocardiaceae</i>	ALASKA	7	4,01	0,80	8,03	0,97	31,88	2,55	37,35	0,72	2,31	1,75	6,33	2,56
2001-34-0007A	<i>Pseudonocardiaceae</i>	ALASKA	7	3,87	0,72	8,01	0,76	32,21	2,38	36,63	0,65	2,45	1,93	6,21	2,98
2001-34-0017A	<i>Pseudonocardiaceae</i>	ALASKA	7	1,69	0,62	9,70	1,48	33,39	6,71	27,13	0,75	2,81	3,59	6,87	2,26
2001-34-0242A	<i>Pseudonocardia</i>	ALASKA	7	4,34	0,55	6,28	1,16	33,19	3,62	36,97	0,70	1,93	1,52	4,92	1,89
MEDIA				3,67	0,71	7,92	1,05	32,37	3,46	35,44	0,66	2,32	2,06	5,97	2,41
MIN				1,69	0,55	6,28	0,76	31,21	2,06	27,13	0,50	1,93	1,52	4,92	1,89
MAX				4,42	0,83	9,70	1,48	33,39	6,71	39,11	0,75	2,81	3,59	6,87	2,98
% cultivos				100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Ácidos grasos mayoritarios de los cultivos agrupados en el *cluster* 8.

Cultivo	Taxonomía inicial	Origen	Cluster	14:0	15:0	16:0	16:0 10METHYL	16:1 CIS 9	16:1 ISO E	17:0 10METHYL	17:1 CIS 9	18:1 CIS 9	18:3 CIS 6,12,14	19:0 ISO	SUMMED FEATURE 4	TBSA 18:0 10METHYL
2001-34-0019A	<i>Rhodococcus</i>	ALASKA	8	5,39	1,37	28,33	0	0	0	0	2,02	9,00	0	0	35,70	10,92
2001-34-0020A	<i>Rhodococcus</i>	ALASKA	8	8,67	1,55	31,03	0	0	0	0	1,63	9,13	0	0	36,25	9,69
2001-34-0016A	<i>Rhodococcus</i>	ALASKA	8	9,31	1,34	30,01	0	0	0	0	0	13,97	1,50	0	31,23	8,30
2001-34-0224A	<i>Rhodococcus</i>	REUNIÓN	8	7,61	0	31,24	2,60	9,37	0	0	0	8,91	2,05	0	26,42	8,75
2001-35-0187A	<i>Nocardia</i>	ALASKA	8	3,12	4,53	20,04	0	1,45	3,94	1,31	3,86	7,11	0	5,29	18,66	7,21
MEDIA				6,82	2,20	28,13	2,60	5,41	3,94	1,31	2,51	9,62	1,77	5,29	29,65	8,97
MIN				3,12	0	20,04	0	0	0	0	0	7,11	0	0	18,66	7,21
MAX				9,31	4,53	31,24	2,60	9,37	3,94	1,31	3,86	13,97	2,05	5,29	36,25	10,92
% cultivos				100	80	100	20	40	20	20	60	100	40	20	100	100

9.4. Anexo 4: Dendrograma de las cepas analizadas mediante FAMEs.



[illegible]



9.5. Anexo 5: Listado con el origen geográfico e identificación de las cepas estudiadas.

Cepa	Origen	Taxonomía inicial	Taxonomía final	Especie válida más cercana según EzTaxon	Accession	Similarity	Cluster FAMES
2001-34-0016A	ALASKA	<i>Rhodococcus</i>	<i>Gordonia</i>	<i>Gordonia sputi</i> DSM 43896 ^T	X80634	99.898	8
2001-34-0019A	ALASKA	<i>Rhodococcus</i>	<i>Gordonia</i>	<i>Gordonia sputi</i> DSM 43896 ^T	X80634	99.666	8
2001-34-0020A	ALASKA	<i>Rhodococcus</i>	<i>Gordonia</i>	<i>Gordonia sputi</i> DSM 43896 ^T	X80634	99.895	8
2001-34-0002A	ALASKA	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0003A	ALASKA	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 ^T	AJ783993	99.479	1
2001-34-0004A	ALASKA	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 ^T	AJ783993	99.486	1
2001-34-0005A	ALASKA	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0006A	ALASKA	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0241A	ALASKA	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				1
2001-35-0187A	ALASKA	<i>Pseudonocardia</i> ?	<i>Nocardia</i>	<i>Nocardia iowensis</i> UI 122540 ^T	DQ925490	98.653	8
2001-34-0007A	ALASKA	<i>Pseudonocardia</i> ?	<i>Pseudonocardia</i>				7
2001-34-0014A	ALASKA	<i>Pseudonocardia</i> ?	<i>Pseudonocardia</i>	<i>Pseudonocardia alni</i> DSM 44104 ^T	Y08535	99.897	7
2001-34-0015A	ALASKA	<i>Pseudonocardia</i> ?	<i>Pseudonocardia</i>	<i>Pseudonocardia alni</i> DSM 44104 ^T	Y08535	99.794	7
2001-34-0017A	ALASKA	<i>Pseudonocardia</i> ?	<i>Pseudonocardia</i>	<i>Pseudonocardia alni</i> DSM 44104 ^T	Y08535	99.898	7
2001-34-0242A	ALASKA	<i>Pseudonocardia</i>	<i>Pseudonocardia</i>	<i>Pseudonocardia alni</i> DSM 44104 ^T	Y08535	99.897	7
2001-34-0239A	ALASKA	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				
2001-34-0243A	ALASKA	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-c
2001-35-0191A	ALASKA	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-a
2001-34-0001A	ALASKA	<i>Pseudonocardia</i> ?	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces thinghirensis</i> DSM 41919 ^T	FM202482	98.692	6-c
2001-34-0008A	ALASKA	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces glauciniger</i> NBRC 100913 ^T	AB249964	99.354	6-a
2001-34-0009A	ALASKA	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces glauciniger</i> NBRC 100913 ^T	AB249964	99.278	6-a
2001-34-0010A	ALASKA	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces recifensis</i> NBRC 12813 ^T	AB184165	99.476	6-a
2001-34-0011A	ALASKA	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces recifensis</i> NBRC 12813 ^T	AB184165	99.477	6-a
2001-34-0012A	ALASKA	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces atrovirens</i> NRRL B-16357 ^T	DQ026672	99.58	6-a
2001-34-0013A	ALASKA	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces pactum</i> NBRC 13433 ^T	AB184398	100	6-c
2001-35-0190A	ALASKA	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> NBRC 15399 ^T	AB184650	99.378	6-f

Cepa	Origen	Taxonomía inicial	Taxonomía final	Especie válida más cercana según EzTaxon	Accession	Similarity	Cluster FAMES
2001-35-0035A	HAWAI	<i>Actinomadura?</i>	<i>Actinomadura</i>				
2001-35-0078A	HAWAI	<i>Actinomadura?</i>	<i>Actinomadura</i>				
2001-35-0088A	HAWAI	<i>Actinomadura?</i>	<i>Actinomadura</i>				
2001-35-0197A	HAWAI	<i>Actinomadura?</i>	<i>Actinomadura</i>				5
2001-35-0199A	HAWAI	<i>Actinomadura?</i>	<i>Actinomadura</i>				5
2001-35-0221A	HAWAI	<i>Actinomadura?</i>	<i>Actinomadura</i>				
2001-35-0223A	HAWAI	<i>Actinomadura?</i>	<i>Actinomadura</i>				
2001-35-0141A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Actinomadura</i>	<i>Actinomadura fulvescens</i> IFO 14347 ^T	U49005	98.335	5
2001-35-0195A	HAWAI	<i>Actinomadura?</i>	<i>Actinomadura</i>	<i>Actinomadura madurae</i> DSM 43067 ^T	X97889	98.826	5
2001-35-0200A	HAWAI	<i>Actinomadura?</i>	<i>Actinomadura</i>	<i>Actinomadura madurae</i> DSM 43067 ^T	X97889	99.396	5
2001-35-0158A	HAWAI	<i>Actinoplanes</i>	<i>Actinoplanes</i>				
2001-35-0172A	HAWAI	<i>Actinoplanes?</i>	<i>Actinoplanes</i>				
2001-35-0017A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Actinoplanes</i>	<i>Actinoplanes deccanensis</i> IFO 13994 ^T	AB036998	98.222	1
2001-35-0020A	HAWAI	<i>Pseudonocardiaceae?</i>	<i>Amycolatopsis</i>	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> NRRL B-24133 ^T	AY183356	99.788	4
2001-35-0021A	HAWAI	<i>Pseudonocardiaceae?</i>	<i>Amycolatopsis</i>	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> NRRL B-24133 ^T	AY183356	99.286	4
2001-35-0023A	HAWAI	<i>Pseudonocardiaceae?</i>	<i>Amycolatopsis</i>	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> NRRL B-24133 ^T	AY183356	99.486	4
2001-35-0024A	HAWAI	<i>Pseudonocardiaceae?</i>	<i>Amycolatopsis</i>	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> NRRL B-24133 ^T	AY183356	99.793	4
2001-35-0025A	HAWAI	<i>Pseudonocardiaceae?</i>	<i>Amycolatopsis</i>	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> NRRL B-24133 ^T	AY183356	99.794	4
2001-35-0026A	HAWAI	<i>Pseudonocardiaceae?</i>	<i>Amycolatopsis</i>	<i>Amycolatopsis kentuckyensis</i> NRRL B-24129 ^T	AY183357	99.28	4
2001-35-0029A	HAWAI	<i>Pseudonocardiaceae?</i>	<i>Amycolatopsis</i>	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> NRRL B-24133 ^T	AY183356	99.794	4
2001-35-0032A	HAWAI	<i>Pseudonocardiaceae?</i>	<i>Amycolatopsis</i>	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> NRRL B-24133 ^T	AY183356	99.793	4
2001-35-0037A	HAWAI	<i>Pseudonocardiaceae?</i>	<i>Amycolatopsis</i>	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> NRRL B-24133 ^T	AY183356	99.495	4
2001-35-0039A	HAWAI	<i>Pseudonocardiaceae?</i>	<i>Amycolatopsis</i>	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> NRRL B-24133 ^T	AY183356	99.586	4
2001-35-0046A	HAWAI	<i>Pseudonocardiaceae?</i>	<i>Amycolatopsis</i>	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> NRRL B-24133 ^T	AY183356	99.794	4
2001-35-0049A	HAWAI	<i>Pseudonocardiaceae?</i>	<i>Amycolatopsis</i>	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> NRRL B-24133 ^T	AY183356	99.793	4
2001-35-0052A	HAWAI	<i>Pseudonocardiaceae?</i>	<i>Amycolatopsis</i>	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> NRRL B-24133 ^T	AY183356	99.581	4
2001-35-0054A	HAWAI	<i>Pseudonocardiaceae?</i>	<i>Amycolatopsis</i>	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> NRRL B-24133 ^T	AY183356	99.792	4

Cepa	Origen	Taxonomía inicial	Taxonomía final	Especie válida más cercana según EzTaxon	Accession	Similarity	Cluster FAMES
2001-35-0063A	HAWAI	<i>Pseudonocardiaceae?</i>	<i>Amycolatopsis</i>	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> NRRL B-24133 ^T	AY183356	99.792	4
2001-35-0150A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Amycolatopsis</i>	<i>Amycolatopsis saalfeldensis</i> HKI0457 ^T	DQ792500	97.734	4
2001-35-0134A	HAWAI	<i>Geodermatophilus</i>	<i>Geodermatophilus</i>				
2001-35-0005A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0008A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				1
2001-35-0010A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				1
2001-35-0012A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0013A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				1
2001-35-0030A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0053A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora chokoriensis</i> 2-19/6 ^T	AB241454	99.38	2
2001-35-0072A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora chokoriensis</i> 2-19/6 ^T	AB241454	100	1
2001-35-0073A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0075A	HAWAI	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora tulbaghiaie</i> TVU1 ^T	EU196562	100	1
2001-35-0076A	HAWAI	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0077A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora chokoriensis</i> 2-19/6 ^T	AB241454	99.28	1
2001-35-0079A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0080A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora tulbaghiaie</i> TVU1 ^T	EU196562	99.892	1
2001-35-0082A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0083A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 ^T	AJ783993	99.891	1
2001-35-0100A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 ^T	AJ783993	99.278	2
2001-35-0106A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora chokoriensis</i> 2-19/6 ^T	AB241454	99.147	1
2001-35-0107A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 ^T	AJ783993	99.889	1
2001-35-0113A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora chalcea</i> DSM 43026 ^T	X92594	99.793	1
2001-35-0114A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 ^T	AJ783993	99.35	1
2001-35-0115A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0116A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0120A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				

Cepa	Origen	Taxonomía inicial	Taxonomía final	Especie válida más cercana según EzTaxon	Accession	Similarity	Cluster FAMES
2001-35-0121A	HAWAI	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0122A	HAWAI	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 ^T	AJ783993	99.896	1
2001-35-0126A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0127A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 ^T	AJ783993	99.38	2
2001-35-0133A	HAWAI	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora lupini</i> lupac 14N ^T	AJ783996	98.967	1
2001-35-0146A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0147A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				1
2001-35-0151A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0152A	HAWAI	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0155A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0156A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0164A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0166A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0168A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0170A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 ^T	AJ783993	98.795	1
2001-35-0174A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora chokoriensis</i> 2-19/6 ^T	AB241454	99.69	1
2001-35-0175A	HAWAI	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0177A	HAWAI	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0178A	HAWAI	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0179A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0184A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 ^T	AJ783993	99.69	1
2001-35-0208A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora chokoriensis</i> 2-19/6 ^T	AB241454	99.585	2
2001-35-0209A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora chokoriensis</i> 2-19/6 ^T	AB241454	99.579	1
2001-35-0211A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				1
2001-35-0212A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora chokoriensis</i> 2-19/6 ^T	AB241454	99.298	1
2001-35-0218A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora chokoriensis</i> 2-19/6 ^T	AB241454	99.381	1
2001-35-0219A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				

Cepa	Origen	Taxonomía inicial	Taxonomía final	Especie válida más cercana según EzTaxon	Accession	Similarity	Cluster FAMES
2001-35-0225A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				1
2001-35-0227A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0228A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0229A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0230A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0231A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0234A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0235A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0239A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0240A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0250A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				1
2001-35-0257A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0262A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0263A	HAWAI	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-35-0119A	HAWAI	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Pseudonocardia</i>	<i>Pseudonocardia alaniniphila</i> YIM 16303 ^T	EU722519	97.345	
2001-35-0196A	HAWAI	<i>Pseudonocardia</i>	<i>Pseudonocardia</i>	<i>Pseudonocardia acaciae</i> GMKU095 ^T	EU921261	96.656	
2001-35-0011A	HAWAI	<i>Pseudonocardiaceae?</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i>				4
2001-35-0140A	HAWAI	<i>Saccharopolyspora</i>	<i>Saccharothrix</i>	<i>Saccharothrix texasensis</i> NRRL B-16107 ^T	AF114815	99.585	4
2001-35-0002A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-c
2001-35-0009A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-c
2001-35-0015A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-a
2001-35-0019A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-a
2001-35-0028A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				
2001-35-0060A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-a
2001-35-0067A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-c
2001-35-0074A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				
2001-35-0081A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				

Cepa	Origen	Taxonomía inicial	Taxonomía final	Especie válida más cercana según EzTaxon	Accession	Similarity	Cluster FAMES
2001-35-0099A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-c
2001-35-0118A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-a
2001-35-0149A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-a
2001-35-0157A	HAWAI	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-c
2001-35-0169A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-a
2001-35-0173A	HAWAI	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-e
2001-35-0180A	HAWAI	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-c
2001-35-0201A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-b
2001-35-0213A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				
2001-35-0214A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				
2001-35-0217A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-a
2001-35-0244A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-a
2001-35-0245A	HAWAI	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-d
2001-35-0001A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces tendae</i> ATCC 19812 ^T	D63873	99.897	6-a
2001-35-0006A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces tendae</i> ATCC 19812 ^T	D63873	100	6-a
2001-35-0014A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces arenae</i> NBRC 13016 ^T	AB249977	99.589	6-a
2001-35-0016A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces violaceolatus</i> DSM 40438 ^T	AF503497	100	6-a
2001-35-0018A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> NBRC 15399 ^T	AB184650	100	6-a
2001-35-0038A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces silaceus</i> NRRL B-24166 ^T	EU812170	98.946	6-a
2001-35-0040A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces arenae</i> NBRC 13016 ^T	AB249977	100	6-a
2001-35-0042A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces arenae</i> NBRC 13016 ^T	AB249977	99.69	6-a
2001-35-0051A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces pactum</i> NBRC 13433 ^T	AB184398	100	6-c
2001-35-0057A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces glomeroaurantiacus</i> NBRC 15418 ^T	AB249983	99.38	6-a
2001-35-0069A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces ambofaciens</i> ATCC 23877 ^T	M27245	99.699	6-a
2001-35-0084A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces griseoaurantiacus</i> NBRC 15440 ^T	AB184676	99.795	6-a
2001-35-0086A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces nogalater</i> JCM 4799 ^T	AB045886	98.914	6-a
2001-35-0087A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces bambergiensis</i> NBRC 13479 ^T	AB184869	100	

Cepa	Origen	Taxonomía inicial	Taxonomía final	Especie válida más cercana según EzTaxon	Accession	Similarity	Cluster FAMES
2001-35-0089A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces violascens</i> NBRC 12920 ^T	AB184246	99.369	6-c
2001-35-0090A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces pulveraceus</i> LMG 20322 ^T	AJ781377	99.48	6-a
2001-35-0092A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces thinghirensis</i> DSM 41919 ^T	FM202482	98.548	6-a
2001-35-0095A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces xanthochromogenes</i> NRRL B-5410 ^T	DQ442559	99.151	6-c
2001-35-0096A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces xanthochromogenes</i> NRRL B-5410 ^T	DQ442559	98.969	6-c
2001-35-0097A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces violascens</i> NBRC 12920 ^T	AB184246	99.356	6-c
2001-35-0101A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces sporoclivatus</i> NBRC 100767 ^T	AB249934	100	6-a
2001-35-0102A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces sporoclivatus</i> NBRC 100767 ^T	AB249934	100	6-a
2001-35-0104A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces fumanus</i> NBRC 13042 ^T	AB184273	99.793	6-a
2001-35-0108A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces novaecaesareae</i> NBRC 13368 ^T	AB184357	99.384	6-d
2001-35-0109A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces violascens</i> NBRC 12920 ^T	AB184246	99.378	6-c
2001-35-0110A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces caniferus</i> NBRC 15389 ^T	AB184640	100	6-a
2001-35-0112A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces novaecaesareae</i> NBRC 13368 ^T	AB184357	99.381	6-a
2001-35-0117A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces netropsis</i> NBRC 3723 ^T	AB184792	99.897	6-c
2001-35-0129A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces murinus</i> NBRC 12799 ^T	AB184155	99.212	6-c
2001-35-0130A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces nogalater</i> JCM 4799 ^T	AB045886	99.281	6-c
2001-35-0131A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces halstedii</i> NBRC 12783 ^T	AB184142	100	6-a
2001-35-0135A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces halstedii</i> NBRC 12783 ^T	AB184142	100	6-a
2001-35-0136A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces longwoodensis</i> LMG 20096 ^T	AJ781356	99.893	6-a
2001-35-0137A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces lienomycini</i> LMG 20091 ^T	AJ781353	99.897	6-a
2001-35-0138A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces lienomycini</i> LMG 20091 ^T	AJ781353	100	6-a
2001-35-0139A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces niveoruber</i> NBRC 15428 ^T	AB184675	100	6-a
2001-35-0142A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces lienomycini</i> LMG 20091 ^T	AJ781353	100	6-a
2001-35-0143A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces flavovirens</i> NBRC 3716 ^T	AB184834	100	6-a
2001-35-0144A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces carpinensis</i> NBRC 14214 ^T	AB184574	99.153	6-a
2001-35-0145A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces niveoruber</i> NBRC 15428 ^T	AB184675	100	6-a
2001-35-0148A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces violascens</i> NBRC 12920 ^T	AB184246	100	6-a

Cepa	Origen	Taxonomía inicial	Taxonomía final	Especie válida más cercana según EzTaxon	Accession	Similarity	Cluster FAMES
2001-35-0159A	HAWAI	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces misionensis</i> NBRC 13063 ^T	AB184285	99.578	6-a
2001-35-0161A	HAWAI	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces griseoplanus</i> AS 4.1868 ^T	AY999894	100	6-c
2001-35-0171A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces mutomycinii</i> NBRC 100999 ^T	AB249951	99.897	6-a
2001-35-0183A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces niveus</i> NRRL 2466 ^T	DQ442532	99.793	6-c
2001-35-0185A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces drozdowiczii</i> NBRC 101007 ^T	AB249957	98.447	6-d
2001-35-0186A	HAWAI	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces cremeus</i> NBRC 12760 ^T	AB184124	99.342	6-a
2001-35-0192A	HAWAI	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces drozdowiczii</i> NBRC 101007 ^T	AB249957	98.486	6-c
2001-35-0193A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces galbus</i> DSM 40089 ^T	X79852	99.587	6-a
2001-35-0205A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces gelaticus</i> NRRL B-2928 ^T	DQ026636	97.708	
2001-35-0216A	HAWAI	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces tendae</i> ATCC 19812 ^T	D63873	99.879	6-a
2001-34-0245A	REUNION	<i>Pseudonocardia</i>	<i>Actinomycetospora</i>	<i>Actinomycetospora chlora</i> TT071-57 ^T	AB514519	99.138	
2001-34-0342A	REUNION	<i>Pseudonocardia</i>	<i>Actinomycetospora</i>	<i>Actinomycetospora lutea</i> TT00-04 ^T	AB514515	98.167	
2001-34-0353A	REUNION	<i>Pseudonocardia?</i>	<i>Actinomycetospora</i>	<i>Actinomycetospora lutea</i> TT00-04 ^T	AB514515	98.468	
2001-34-0081A	REUNION	<i>Actinoplanes</i>	<i>Actinoplanes</i>				
2001-34-0219A	REUNION	<i>Actinoplanes</i>	<i>Actinoplanes</i>				
2001-34-0028A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Actinoplanes</i>	<i>Actinoplanes digitatis</i> IFO 12512 ^T	AB037000	98.875	
2001-34-0182A	REUNION	<i>Actinoplanes</i>	<i>Actinoplanes</i>	<i>Actinoplanes cyaneus</i> DSM 46137 ^T	X93186	99.276	
2001-34-0046A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Amycolatopsis</i>	<i>Amycolatopsis pretoriensis</i> NRRL B-24133 ^T	AY183356	99.072	4
2001-34-0068A	REUNION	<i>Pseudonocardiaceae?</i>	<i>Amycolatopsis</i>	<i>Amycolatopsis kentuckyensis</i> NRRL B-24129 ^T	AY183357	99.377	4
2001-34-0079A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Amycolatopsis</i>	<i>Amycolatopsis lexingtonensis</i> NRRL B-24131 ^T	AY183358	98.555	4
2001-34-0082A	REUNION	<i>Amycolatopsis?</i>	<i>Amycolatopsis</i>	<i>Amycolatopsis kentuckyensis</i> NRRL B-24129 ^T	AY183357	99.585	4
2001-34-0203A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Amycolatopsis</i>	<i>Amycolatopsis kentuckyensis</i> NRRL B-24129 ^T	AY183357	99.588	4
2001-34-0266A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Amycolatopsis</i>	<i>Amycolatopsis thermalba</i> SF45 ^T	HQ668525	98.862	4
2001-34-0359A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Amycolatopsis</i>	<i>Amycolatopsis kentuckyensis</i> NRRL B-24129 ^T	AY183357	99.196	
2001-34-0224A	REUNION	<i>Rhodococcus</i>	<i>Gordonia</i>				8
2001-34-0021A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0053A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				

Cepa	Origen	Taxonomía inicial	Taxonomía final	Especie válida más cercana según EzTaxon	Accession	Similarity	Cluster FAMES
2001-34-0058A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora humi</i> P0402 ^T	GU459068	99.262	2
2001-34-0059A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora chokoriensis</i> 2-19/6 ^T	AB241454	99.066	1
2001-34-0060A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora chokoriensis</i> 2-19/6 ^T	AB241454	99.063	1
2001-34-0062A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 ^T	AJ783993	99.582	1
2001-34-0063A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 ^T	AJ783993	99.689	1
2001-34-0064A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora peucetia</i> DSM 43363 ^T	X92603	99.585	2
2001-34-0106A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora chokoriensis</i> 2-19/6 ^T	AB241454	99.064	1
2001-34-0108A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0110A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora humi</i> P0402 ^T	GU459068	99.153	2
2001-34-0111A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora humi</i> P0402 ^T	GU459068	99.274	2
2001-34-0112A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora humi</i> P0402 ^T	GU459068	99.271	2
2001-34-0115A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora humi</i> P0402 ^T	GU459068	99.274	2
2001-34-0116A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora humi</i> P0402 ^T	GU459068	99.271	2
2001-34-0117A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora humi</i> P0402 ^T	GU459068	99.158	2
2001-34-0118A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora peucetia</i> DSM 43363 ^T	X92603	99.586	2
2001-34-0119A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora peucetia</i> DSM 43363 ^T	X92603	99.569	2
2001-34-0120A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0121A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora peucetia</i> DSM 43363 ^T	X92603	99.346	2
2001-34-0163A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0166A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0255A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora humi</i> P0402 ^T	GU459068	99.275	2
2001-34-0257A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0258A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0259A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0260A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora humi</i> P0402 ^T	GU459068	99.084	2
2001-34-0261A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora peucetia</i> DSM 43363 ^T	X92603	99.586	2
2001-34-0262A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				

Cepa	Origen	Taxonomía inicial	Taxonomía final	Especie válida más cercana según EzTaxon	Accession	Similarity	Cluster FAMES
2001-34-0263A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0264A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora chokoriensis</i> 2-19/6 ^T	AB241454	98.778	1
2001-34-0269A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora humi</i> P0402 ^T	GU459068	99.072	2
2001-34-0271A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora humi</i> P0402 ^T	GU459068	99.272	2
2001-34-0272A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 ^T	AJ783993	99.595	1
2001-34-0273A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0274A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora humi</i> P0402 ^T	GU459068	99.259	2
2001-34-0275A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				2
2001-34-0276A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora humi</i> P0402 ^T	GU459068	99.277	2
2001-34-0277A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0278A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0279A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora humi</i> P0402 ^T	GU459068	99.273	2
2001-34-0283A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0284A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0286A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0287A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora humi</i> P0402 ^T	GU459068	99.171	2
2001-34-0288A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0289A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora humi</i> P0402 ^T	GU459068	99.037	2
2001-34-0290A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0293A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0296A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora humi</i> P0402 ^T	GU459068	99.278	2
2001-34-0297A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora saelicesensis</i> Lupac 09 ^T	AJ783993	99.586	1
2001-34-0298A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora humi</i> P0402 ^T	GU459068	99.275	2
2001-34-0299A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora humi</i> P0402 ^T	GU459068	99.262	2
2001-34-0300A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0303A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0309A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora humi</i> P0402 ^T	GU459068	99.151	2

Cepa	Origen	Taxonomía inicial	Taxonomía final	Especie válida más cercana según EzTaxon	Accession	Similarity	Cluster FAMEs
2001-34-0310A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora humi</i> P0402 ^T	GU459068	99.176	2
2001-34-0311A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora humi</i> P0402 ^T	GU459068	99.276	2
2001-34-0312A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora humi</i> P0402 ^T	GU459068	99.276	2
2001-34-0313A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora humi</i> P0402 ^T	GU459068	99.262	2
2001-34-0314A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0315A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0316A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0317A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0318A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora humi</i> P0402 ^T	GU459068	99.275	2
2001-34-0319A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0321A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0324A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora humi</i> P0402 ^T	GU459068	98.901	2
2001-34-0331A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora aurantiaca</i> ATCC 27029 ^T	CP002162	98.664	1
2001-34-0332A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0333A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora aurantiaca</i> ATCC 27029 ^T	CP002162	98.862	1
2001-34-0334A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0335A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora humi</i> P0402 ^T	GU459068	99.276	2
2001-34-0336A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0338A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0341A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora peucetia</i> DSM 43363 ^T	X92603	99.586	2
2001-34-0344A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0346A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0349A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0350A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0351A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0357A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0364A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				

Cepa	Origen	Taxonomía inicial	Taxonomía final	Especie válida más cercana según EzTaxon	Accession	Similarity	Cluster FAMES
2001-34-0365A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0366A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora peucetia</i> DSM 43363 ^T	X92603	99.585	2
2001-34-0368A	REUNION	<i>Micromonospora</i>	<i>Micromonospora</i>				
2001-34-0330A	REUNION	<i>Planobispora</i>	<i>Planobispora</i>				
2001-34-0267A	REUNION	<i>Pseudonocardia</i>	<i>Pseudonocardaceae</i>				
2001-34-0308A	REUNION	<i>Pseudonocardia</i>	<i>Pseudonocardaceae</i>				
2001-34-0050A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Pseudosporangium</i>	<i>Pseudosporangium ferrugineum</i> 3-44-a-19 ^T	AB302183	99.161	3
2001-34-0085A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	micelio estéril				4
2001-34-0113A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	micelio estéril				4
2001-34-0265A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	micelio estéril				
2001-34-0281A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	micelio estéril				
2001-34-0285A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	micelio estéril				
2001-34-0295A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	micelio estéril				
2001-34-0354A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	micelio estéril				
2001-34-0360A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	micelio estéril				
2001-34-0022A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-a
2001-34-0025A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-c
2001-34-0030A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				
2001-34-0035A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				
2001-34-0044A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-c
2001-34-0048A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				
2001-34-0052A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-c
2001-34-0071A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-c
2001-34-0086A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-a
2001-34-0090A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-b
2001-34-0092A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-c
2001-34-0101A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-c

Cepa	Origen	Taxonomía inicial	Taxonomía final	Especie válida más cercana según EzTaxon	Accession	Similarity	Cluster FAMES
2001-34-0103A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-c
2001-34-0125A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-b
2001-34-0126A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-e
2001-34-0134A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-c
2001-34-0146A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-c
2001-34-0148A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				
2001-34-0149A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-e
2001-34-0151A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-c
2001-34-0167A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-c
2001-34-0172A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-c
2001-34-0174A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-d
2001-34-0179A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-c
2001-34-0192A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-c
2001-34-0195A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-a
2001-34-0198A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-c
2001-34-0199A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-c
2001-34-0202A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-c
2001-34-0216A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-c
2001-34-0218A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-c
2001-34-0220A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				
2001-34-0232A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				
2001-34-0280A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				
2001-34-0294A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-f
2001-34-0301A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-a
2001-34-0320A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-c
2001-34-0345A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				
2001-34-0348A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				

Cepa	Origen	Taxonomía inicial	Taxonomía final	Especie válida más cercana según EzTaxon	Accession	Similarity	Cluster FAMES
2001-34-0361A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				
2001-34-0362A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>				6-c
2001-34-0023A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> NBRC 3178 ^T	AB184737	98.862	6-c
2001-34-0031A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces seoulensis</i> NBRC 16668 ^T	AB249970	100	6-c
2001-34-0054A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces globisporus</i> subsp. <i>globisporus</i> NRRL B-2293 ^T	DQ026634	99.587	6-a
2001-34-0057A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces coeruleorubidus</i> NBRC 12844 ^T	AB184849	98.66	6-b
2001-34-0061A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces misionensis</i> NBRC 13063 ^T	AB184285	99.793	6-c
2001-34-0065A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces seoulensis</i> NBRC 16668 ^T	AB249970	100	6-c
2001-34-0067A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> NBRC 3178 ^T	AB184737	98.729	6-c
2001-34-0070A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces vinaceus</i> NBRC 13425 ^T	AB184394	99.887	6-a
2001-34-0074A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> NBRC 3178 ^T	AB184737	98.746	6-c
2001-34-0087A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces cirratus</i> NRRL B-3250 ^T	AY999794	100	6-c
2001-34-0096A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces seoulensis</i> NBRC 16668 ^T	AB249970	99.897	6-c
2001-34-0098A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> NBRC 3178 ^T	AB184737	98.636	6-c
2001-34-0100A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> NBRC 3178 ^T	AB184737	98.866	6-c
2001-34-0104A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces seoulensis</i> NBRC 16668 ^T	AB249970	99.897	6-c
2001-34-0105A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces virginiae</i> NBRC 12827 ^T	AB184175	100	6-c
2001-34-0122A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces seoulensis</i> NBRC 16668 ^T	AB249970	100	6-c
2001-34-0123A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces seoulensis</i> NBRC 16668 ^T	AB249970	99.897	6-c
2001-34-0137A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces misionensis</i> NBRC 13063 ^T	AB184285	98.764	6-d
2001-34-0141A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> NBRC 3178 ^T	AB184737	98.843	6-c
2001-34-0150A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces caelestis</i> NRRL 2418 ^T	X80824	99.383	6-a
2001-34-0152A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces libani</i> subsp. <i>rufus</i> LMG 20087 ^T	AJ781351	99.587	6-a
2001-34-0153A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces libani</i> subsp. <i>rufus</i> LMG 20087 ^T	AJ781351	99.794	6-a
2001-34-0157A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces seoulensis</i> NBRC 16668 ^T	AB249970	100	6-c
2001-34-0158A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces lydicus</i> NBRC 13058 ^T	AB184281	99.691	6-a
2001-34-0171A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces misionensis</i> NBRC 13063 ^T	AB184285	98.759	6-d

Cepa	Origen	Taxonomía inicial	Taxonomía final	Especie válida más cercana según EzTaxon	Accession	Similarity	Cluster FAMES
2001-34-0176A	REUNION	no- <i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces arenae</i> NBRC 13016 ^T	AB249977	99.585	6-a
2001-34-0178A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces drozdowiczii</i> NBRC 101007 ^T	AB249957	99.682	6-c
2001-34-0183A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces recifensis</i> NBRC 12813 ^T	AB184165	99.788	6-c
2001-34-0184A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces seoulensis</i> NBRC 16668 ^T	AB249970	99.897	6-c
2001-34-0186A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> NBRC 3178 ^T	AB184737	98.83	6-c
2001-34-0190A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces misionensis</i> NBRC 13063 ^T	AB184285	99.683	6-a
2001-34-0193A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> NBRC 3178 ^T	AB184737	98.861	6-c
2001-34-0194A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces purpurascens</i> NBRC 13077 ^T	AB184859	98.733	6-b
2001-34-0196A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces axinellae</i> Pol001 ^T	EU683612	98.56	
2001-34-0201A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> NBRC 3178 ^T	AB184737	98.865	6-c
2001-34-0210A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces chartreusis</i> NBRC 12753 ^T	AB184839	99.172	6-c
2001-34-0211A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces neopectinius</i> KNF 2047 ^T	EU258679	99.482	6-c
2001-34-0212A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces neopectinius</i> KNF 2047 ^T	EU258679	99.481	6-c
2001-34-0213A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces chartreusis</i> NBRC 12753 ^T	AB184839	99.171	6-c
2001-34-0214A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces neopectinius</i> KNF 2047 ^T	EU258679	99.481	6-c
2001-34-0215A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces neopectinius</i> KNF 2047 ^T	EU258679	99.482	6-c
2001-34-0217A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> NBRC 3178 ^T	AB184737	98.704	6-c
2001-34-0221A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces misionensis</i> NBRC 13063 ^T	AB184285	99.794	6-c
2001-34-0222A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces misionensis</i> NBRC 13063 ^T	AB184285	99.792	6-c
2001-34-0223A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces gramineus</i> JR-43 ^T	HM748598	99.778	6-a
2001-34-0225A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces seoulensis</i> NBRC 16668 ^T	AB249970	100	6-c
2001-34-0226A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces phaeoluteichromatogenes</i> NRRL 5799 ^T	AJ391814	98.255	6-b
2001-34-0256A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> NBRC 3178 ^T	AB184737	98.762	6-c
2001-34-0291A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces olivochromogenes</i> NBRC 3178 ^T	AB184737	98.686	6-c
2001-34-0302A	REUNION	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces purpurascens</i> NBRC 13077 ^T	AB184859	98.76	6-b
2001-34-0282A	REUNION	<i>Streptosporangium</i>	<i>Streptosporangium</i>	<i>Streptosporangium longisporum</i> DSM 43180 ^T	X89944	98.131	5
2001-34-0358A	REUNION	<i>Actinomadura?</i>	<i>Streptosporangium</i>	<i>Streptosporangium longisporum</i> DSM 43180 ^T	X89944	98.113	5

9.6. Anexo 6: coeficientes de proximidad y de distancia y métodos de *clustering*.

1.- Medidas de distancia y de similitud.

(i) Distancia city-block: (también llamada distancia Manhattan o distancia de valor absoluto): se define por la siguiente fórmula:

$$d_{ij} = \sum_{k=1}^n |x_{ik} - x_{jk}|$$

donde d_{ij} es la disimilitud entre los objetos i y j y x_{ik} es el valor que el objeto i toma para el carácter k y x_{jk} es el valor que el objeto j toma para el carácter k .

(ii) Distancia euclidiana: es una medida de disimilitud y viene expresada por la siguiente fórmula:

$$d_{ij} = \sqrt{\sum_{k=1}^N (x_{ik} - x_{jk})^2}$$

donde d_{ij} es la distancia entre los objetos i y j y x_{ik} es el valor que el objeto i toma para el carácter k y x_{jk} es el valor que el objeto j toma para el carácter k y N el número total de caracteres.

Cuando se comparan patrones de electroforesis, la matriz de similitudes puede basarse en el coeficiente de correlación de Pearson o en alguno de los coeficientes basados en bandas.

(iii) Coeficiente de correlación de Pearson o momento-producto: la similitud entre dos objetos se calcula como la correlación entre dos series de valores de los caracteres (generalmente valores densitométricos) tomados por cada uno de los dos objetos.

$$S_{i,j} = \frac{\sum_{k=1}^N (x_{ik} - \bar{x}_i) (x_{jk} - \bar{x}_j)}{\sqrt{\sum_{k=1}^N (x_{ik} - \bar{x}_i)^2 \sum_{k=1}^N (x_{jk} - \bar{x}_j)^2}}$$

donde $S_{i,j}$ es la similitud, es decir, el coeficiente de correlación entre los objetos i y j , x_{ik} es el valor que toma el objeto i para el carácter k . El valor del coeficiente de correlación varía entre +1, en el caso de una asociación perfecta, a -1 para una asociación negativa; un valor de 0 indica que no hay asociación. El coeficiente de correlación es una medida de la forma, es decir, es sensible al perfil de valles y picos a lo largo de los valores del carácter.

(iv) Coeficientes de similitud basados en bandas: se basan en la presencia (1) o ausencia (0) de una banda en una posición determinada.

- a) Coeficiente de Jaccard: la similitud entre dos perfiles de bandas es el número de bandas coincidentes dividido por el número total de bandas en ambos perfiles (es decir, las bandas coincidentes más las bandas específicas de cada perfil)

$$S_{i,j} = \frac{n_{i,j}}{n_i + n_j - n_{i,j}}$$

donde $S_{i,j}$ es la similitud entre los perfiles i y j , $n_{i,j}$ es el número de bandas coincidentes en i y j , n_i es el número total de bandas para i y n_j es el número total de bandas para j . Si todas las bandas en i coinciden con las de j y viceversa, entonces $S_{i,j} = 1$.

- b) Coeficiente sensible al área: este coeficiente es parecido al anterior pero tiene en cuenta las posibles diferencias en el área de las bandas coincidentes

$$S_{i,j} = \frac{A_{i,j}}{n_i + n_j - n_{i,j}}$$

donde

$$A_{i,j} = \sum_{k=1}^{n_{i,j}} \frac{n_{i,j} \alpha}{\alpha + |B_{i,k} - B_{j,k}|}$$

donde α es una constante y $|B_{i,k} - B_{j,k}|$ es la diferencia absoluta entre las áreas de la k -ésima banda coincidente entre i y j , donde k varía entre 1 y $n_{i,j}$. Así pues, las diferencias en las áreas de las bandas coincidentes están penalizadas. Si las áreas de todas las bandas coincidentes de ambos perfiles son iguales, este coeficiente se reduce al coeficiente de Jaccard.

- c) Coeficiente de Dice: este coeficiente es muy parecido al de Jaccard pero da más peso a las bandas coincidentes, mientras que Jaccard da más peso a las diferencias

$$S_{i,j} = \frac{2 n_{i,j}}{n_i + n_j}$$

donde $S_{i,j}$ es la similitud entre los perfiles i y j , $n_{i,j}$ es el número de bandas coincidentes en i y j , n_i es el número total de bandas para i y n_j es el número total de bandas para j .

2. Métodos de clustering.

(i) UPGMA o media del grupo: método no ponderado de agrupamiento por parejas mediante medias aritméticas (unweighted pair group method using arithmetic averages). El método se basa en que la disimilitud entre un objeto o *cluster* k y un *cluster* l formado al unir los objetos o *clusters* i y j , es sencillamente la media de las disimilitudes entre k e i y entre k y j . Esto viene dado por la fórmula:

$$D_{k,l} = \frac{N_i D_{k,i} + N_j D_{k,j}}{N_i + N_j}$$

donde k es la notación usada para nombrar un objeto o *cluster* ya existente y l es la notación usada para nombrar el *cluster* nuevamente formado; $D_{k,l}$ es la disimilitud entre k y l ; N_i es el número de objetos en el *cluster* i y N_j es el número de objetos en el *cluster* j . Este método de *clustering* minimiza la disimilitud media entre los objetos dentro de un “cluster”. Este método se puede aplicar a todas las medidas de similitud.

(ii) Promedio de Ward: con este método los *clusters* u objetos se unen de tal modo que se produce un incremento mínimo de la varianza total del grupo. Esto da como resultado las siguientes características: a) a menudo se encuentran *clusters* aberrantes formados por objetos que no tienen nada en común entre sí salvo que son disimilares al resto de objetos; b) se pueden distinguir más grupos en las áreas más densas del espacio de caracteres, donde están la mayoría de los objetos.

